



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 994 122**

⑮ Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2016 E 21191711 (7)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3981792**

⑮ Título: **Moléculas de unión a PD-1 y métodos de uso de las mismas**

⑯ Prioridad:

**30.07.2015 US 201562198867 P**  
**09.10.2015 US 201562239559 P**  
**13.11.2015 US 201562255140 P**  
**15.04.2016 US 201662322974 P**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.01.2025**

⑯ Titular/es:

**MACROGENICS, INC. (100.00%)**  
**9704 Medical Center Drive**  
**Rockville, MD 20850, US**

⑯ Inventor/es:

**SHAH, KALPANA;**  
**SMITH, DOUGLAS, H.;**  
**LA MOTTE-MOHS, ROSS;**  
**JOHNSON, LESLIE, S.;**  
**MOORE, PAUL, A.;**  
**BONVINI, EZIO y**  
**KOENIG, SCOTT**

⑯ Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 994 122 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión a PD-1 y métodos de uso de las mismas

5 **Campo Técnico**

Moléculas de unión a PD-1 que comprenden el dominio de unión a PD-1 de anticuerpos anti-PD-1 seleccionados capaces de unirse tanto a PD-1 de mono cynomolgus como a PD-1 humana: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, se divultan, pero no se reivindican en el presente documento. Moléculas de unión a PD-1 que son versiones humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos, o que comprenden fragmentos de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 (especialmente inmunocongugados, diacuerpos, BiTE, anticuerpos biespecíficos, etc.), se divultan, pero no se reivindican en el presente documento. Moléculas de unión a PD-1 que, además, son capaces de unirse a un epítopo de una molécula implicada en la regulación de un punto de control inmunológico que está presente en la superficie de una célula inmunitaria, se divultan, pero no se reivindican en el presente documento. La presente invención se refiere a moléculas de unión a PD-1 de la invención como se define en las reivindicaciones 1-6, para su uso en métodos para estimular una respuesta inmunitaria. En particular, invención se refiere a moléculas de unión a PD-1 de la invención como se define en las reivindicaciones 1-6, para su uso en métodos de terapia de combinación en los que una molécula de unión a PD-1 que comprende uno o más dominios de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 seleccionados se administra en combinación con una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria y/o en combinación con una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno de cáncer.

25 **Antecedentes de la invención**

**Respuestas inmunitarias mediadas por células**

El sistema inmunitario de los humanos y otros mamíferos es responsable de proporcionar protección contra infecciones y enfermedades. Tal protección es proporcionada tanto por una respuesta inmunitaria humoral como por una respuesta inmunitaria mediada por células. La respuesta humoral da como resultado la producción de anticuerpos y otras biomoléculas que son capaces de reconocer y neutralizar objetivos extraños (antígenos). Por el contrario, la respuesta inmunitaria mediada por células implica la activación de macrófagos, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno por las células T, y la liberación de varias citoquinas en respuesta al reconocimiento de un antígeno (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1): 39-48).

La capacidad de las células T para mediar de manera óptima una respuesta inmunitaria contra un antígeno requiere dos interacciones de señalización distintas (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating CoStimulation", Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "CheckpointBlockade in Cancer Immunotherapy", Adv. Immunol. 90:297-339). En primer lugar, el antígeno que se ha dispuesto en la superficie de las células presentadoras de antígeno (**APC**) debe presentarse a una célula T CD4<sup>+</sup> T virgen específica de antígeno. Dicha presentación suministra una señal a través del receptor de células T (**TCR**) que dirige a la célula T para iniciar una respuesta inmunitaria que será específica para el antígeno presentado. En segundo lugar, una serie de señales coestimuladoras e inhibidoras, mediadas a través de interacciones entre las APC y distintas moléculas de superficie de las células T, desencadenan primero la activación y proliferación de las células T y, en última instancia, su inhibición. Así, la primera señal confiere especificidad a la respuesta inmunitaria mientras que la segunda señal sirve para determinar la naturaleza, magnitud y duración de la respuesta.

El sistema inmunitario está estrictamente controlado por ligandos y receptores coestimuladores y coinhibidores. Estas moléculas proporcionan la segunda señal para la activación de las células T y proporcionan una red equilibrada de señales positivas y negativas para maximizar las respuestas inmunitarias contra la infección a la vez que limitan la inmunidad uno mismo (Wang, L. et al. (7 de marzo de 2011) " VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses," J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections," Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets 8:279-288). Es de particular importancia la unión entre los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de la célula presentadora de antígeno y los receptores de CD28 y CTLA-4 del linfocito T CD4<sup>+</sup> (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," Immunol. Rev. 229:307-321). La unión de B7.1 o de B7.2 a CD28 estimula la activación de las células T; la unión de B7.1 o B7.2 a CTLA-4 inhibe dicha activación (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," Immunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de las células T (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor

5 CD28 In The Mouse," *J. Immunol.* 149:380-388), mientras que la expresión de CTLA-4 se regula rápidamente por incremento después de la activación de las células T (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement," *Immunity* 4:535-543). Como CTLA-4 es el receptor de mayor afinidad (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), la unión inicia en primer lugar la proliferación de células T (a través de CD28) y luego la inhibe (a través de la expresión naciente de CTLA-4), amortiguando de este modo el efecto cuando la proliferación ya no es necesaria.

10 Investigaciones adicionales sobre los ligandos del receptor CD28 han llevado a la identificación y caracterización de un conjunto de moléculas B7 relacionadas (la "Superfamilia B7") Coyle, A.J. et al. (2001) "The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function," *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The ExtendedB7 Family And Regulatory T-Cells," *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance," *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) "CD28/B7 System of T-Cell Costimulation," *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses," *Microbes Infect.* 6:759-766). Actualmente hay varios miembros conocidos de la familia: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), el ligando coestimulador inducible (ICOS-L), el ligando 1 de muerte programada (PD-L1; B7-H1), el ligando 2 de muerte programada (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 y B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC," *Immunogenetics* *epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2*.

## II. Muerte programada-1 ("PD-1")

30 La muerte programada-1 ("PD-1", también conocida como "CD279") es una proteína de membrana de tipo I de aproximadamente 31 kD miembro de la familia extendida de reguladores de células T CD28/CTLA-4 que regula de manera generalizada las respuestas inmunitarias (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895; Publicación de solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; Patentes de Estados Unidos Nº 6.808.710; 7.101.550; 7.488.802; 7.635.757; 7.722.868; Publicación de PCT Nº WO 01/14557).

35 PD-1 se expresa en células T activadas, células B y monocitos (Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," *Int. Immunol.* 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al. (2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC," *J. Immunol.* 169:5538-5545) y en niveles bajos en células T asesinas naturales (NK) (Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice," *J. Exp. Med.* 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298).

40 45 La región extracelular de PD-1 consiste de un único dominio V de inmunoglobulina (Ig) con un 23% de identidad con el dominio equivalente en CTLA-4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). El dominio de IgV extracelular va seguido de una región transmembrana y una cola intracelular. La cola intracelular contiene dos sitios de fosforilación localizados en un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina y un motivo comutador inmunorreceptor basado en tirosina, lo que sugiere que PD-1 regula negativamente las señales de TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. et al. (2006) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To TCell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer," *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745).

50 55 PD-1 media su inhibición del sistema inmunitario uniéndose a B7-H1 y B7-DC (Flies, DB et al. (2007) "he New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity", *J. Immunother.* 30 (3): 251-260; Patentes de Estados Unidos Nº 6.803.192; 7.794.710; Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; Publicaciones de PCT Nº WO 01/39722; WO 02/086083).

60 65 B7-H1 y B7-DC se expresan ampliamente en las superficies de tejidos humanos y murinos, como corazón, placenta, músculo, hígado fetal, bazo, ganglios linfáticos y timo, así como hígado, pulmón, riñón, células de islotes del páncreas y el intestino delgado murinos (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). En humanos, se ha descubierto expresión de la proteína B7-H1 en células endoteliales humanas (Chen, Y. et al. (2005) "Expression of B7 H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells," *Nephron. Exp. Nephrol.* 102:e81-e92; de Hajj, S. et al. (2005) "Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell

Responses Via ICOS-L And B7-H1" Kidney Int. 68:2091-2102; Mazanet, M.M. et al. (2002) "B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis," J. Immunol. 169:3581-3588), myocardium (Brown, J.A. et al. (2003) "Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production," J. Immunol. 170:1257-1266), sinciciotrofoblastos (Petroff, M.G. et al. (2002) "B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface," Placenta 23:S95-S101). Las moléculas también se expresan por macrófagos residentes de algunos tejidos, por macrófagos que han sido activados con interferón (IFN)- $\gamma$  o factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation," Nat. Immunol 2:261-268), y en tumores (Dong, H. (2003) " B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity", J. Mol. Med. 81: 281-287).

Se ha descubierto que la interacción entre B7-H1 y PD-1 proporciona una señal coestimuladora negativa crucial para las células T y B (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", Semin. Cancer Biol. 17(4): 288-298) y funciona como un inductor de muerte celular (Ishida, Y. et al. (1992) " Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programme Cell Death", EMBO J. 11: 3887-3895; Subudhi, SK et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition", J. Molec. Med. 83:193-202). Más específicamente, se ha descubierto que la interacción entre bajas concentraciones del receptor PD-1 y el ligando B7-H1 da como resultado la transmisión de una señal inhibidora que inhibe fuertemente la proliferación de células T CD8 $^{+}$  específicas de antígeno; a concentraciones más altas, las interacciones con PD-1 no inhiben la proliferación de células T pero reducen notablemente la producción de múltiples citoquinas (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126). Se ha descubierto que la proliferación de células T y la producción de citoquinas por las células T CD4 y CD8 tanto en reposo como previamente activadas, e incluso las células T vírgenes de sangre del cordón umbilical, son inhibidas por las proteínas de fusión B7-H1-Fc solubles (Freeman, G.J. et al. (2000) "Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation," J. Exp. Med. 192:1-9; Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation," Nature Immunol. 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2," Eur. J. Immunol. 32(3):634-643; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," Nature Rev. Immunol. 2:116-126).

El papel de B7-H1 y PD-1 en la inhibición de la activación y proliferación de células T ha sugerido que estas biomoléculas podrían servir como objetivos terapéuticos para tratamientos de inflamación y cáncer. Por tanto, se ha propuesto el uso de anticuerpos anti-PD-1 para tratar infecciones y tumores y modular de manera positiva una respuesta inmunitaria adaptativa (ver, Publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos Nº 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; Patentes de Estados Unidos Nº 7.521.051; 7.563.869; 7.595.048; Publicaciones de PCT Nº WO 2004/056875; WO 2008/083174). Se ha informado de anticuerpos capaces de unirse específicamente a PD-1 por Agata, T. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," Int. Immunol. 8(5):765-772; y Berger, R. et al. (2008) "Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies," Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 (ver también, Patentes de Estados Unidos Nº 8,008,449 y 8,552,154; Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 y 2014/0044738; y Publicaciones de Patente de PCT Nº WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549; y WO 2013/014668).

Sin embargo, a pesar de todos estos avances anteriores, sigue habiendo una necesidad de composiciones mejoradas capaces de dirigir más vigorosamente el sistema inmunitario del cuerpo para que ataque las células cancerosas o las células infectadas por patógenos, especialmente a concentraciones terapéuticas más bajas. Porque aunque el sistema inmunitario adaptativo puede ser un potente mecanismo de defensa contra el cáncer y la enfermedad, a menudo se ve obstaculizado por mecanismos inmunosupresores en el microambiente tumoral, como la expresión de PD-1. Además, las moléculas coinhibidoras expresadas por células tumorales, células inmunitarias y células estromales en el medio tumoral pueden atenuar de manera dominante las respuestas de las células T contra las células cancerosas. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de moléculas de unión a PD-1 potentes. En particular, hay una necesidad de moléculas de unión a PD-1 potentes que tengan un perfil cinético de unión deseable y que antagonicen el eje PD-1/PD-L1 bloqueando la interacción PD-1/PD-L1, lo que podría proporcionar un valor terapéutico mejorado a los pacientes que padecen de cáncer u otras enfermedades y afecciones. La presente divulgación está dirigida a estos y otros objetivos.

La WO 2014194302 se refiere a composiciones y métodos relacionados con o derivados de anticuerpos anti-PD-1. La WO 2014179664 se refiere a un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina aislado y un polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina aislado que se unen a una proteína de muerte programada-1 (PD-1).

## 60 Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable, en donde dicho dominio de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 147, y dicho

dominio de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 153, para su uso en combinación con una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, en la que dichas una o más moléculas adicionales son anticuerpos, para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T de un sujeto que la necesite. La presente invención también se dirige a una o más moléculas que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, en la que dicha una o más moléculas son anticuerpos, para su uso en combinación con un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable, en el que: dicho dominio de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho dominio de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T de un sujeto que lo necesite. La presente invención se dirige además a una combinación de un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable, en el que: dicho dominio de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho dominio de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, y una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, en el que dichas una o más moléculas adicionales son anticuerpos, para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria mediada por células T de un sujeto que lo necesite. La presente invención se dirige a un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable, en el que: dicho dominio de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho dominio de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153 para su uso en combinación con otro agente anticanceroso, y/o una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno canceroso, en el tratamiento del cáncer. La presente invención también se dirige a un agente anticanceroso, y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno canceroso, para su uso en combinación con un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable, en el que: dicho dominio de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho dominio de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, en el tratamiento del cáncer. La presente invención se dirige además a una combinación de un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable, en el que: dicho dominio de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho dominio de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, y un agente anticancerígeno y/o una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno, para su uso en el tratamiento del cáncer. La invención se define por las reivindicaciones y cualesquiera otros aspectos, configuraciones, instancias o realizaciones expuestos en el presente documento que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones son sólo a título informativo. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento (o diagnóstico) se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico). Moléculas de unión a PD-1 que comprenden el dominio de unión a PD-1 de anticuerpos anti-PD-1 seleccionados capaces de unirse tanto a PD-1 de mono cynomolgus como a PD-1 humano: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, se divultan, pero no se reivindican en el presente documento. Moléculas de unión a PD-1 que están humanizadas o son versiones químicas de tales anticuerpos, o que comprenden fragmentos de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 (especialmente inmunocogados, diacuerpos, BiTEs, anticuerpos biespecíficos, etc.), se divultan, pero no se reivindican en el presente documento. Moléculas de unión a PD-1 que, además, son capaces de unirse a un epítopo de una molécula implicada en la regulación de un punto de control inmunológico que está presente en la superficie de una célula inmunitaria, se divultan, pero no se reivindican en el presente documento. La presente invención se refiere a moléculas de unión a PD-1 de la invención, como se define en las reivindicaciones 1-6, para su uso en métodos para estimular una respuesta inmune. En particular, la presente invención, se refiere a moléculas de unión a PD-1 de la invención, como se define en las reivindicaciones 1-6, para su uso en métodos de terapia de combinación en los que una molécula de unión a PD-1 que comprende uno o más dominios de unión a PD-1 de dichos anticuerpos anti-PD-1 seleccionados se administra en combinación con una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmune y/o en combinación con una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno canceroso.

En detalle, la divulgación proporciona una molécula de unión a anti-PD-1 humana, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, que comprende los tres dominios de CDR de cadena pesada, CDR<sub>H1</sub>, CDR<sub>H2</sub> y CDR<sub>H3</sub> y los tres dominios de CDR de cadena ligera, CDR<sub>L1</sub>, CDR<sub>L2</sub> y CDR<sub>L3</sub>, en donde:

(A)

- (1) el dominio de CDR<sub>H1</sub>, el dominio de CDR<sub>H2</sub> y el dominio de CDR<sub>H3</sub> son las CDR de cadena pesada de hPD-1 mAb 7(1.2), y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 y SEQ ID NO: 141**; y
- (2) el dominio de CDR<sub>L1</sub>, el dominio de CDR<sub>L2</sub> y el dominio de CDR<sub>L3</sub> son las CDR de cadena ligera de hPD-1 mAb 7(1.2), y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 145 y**

## SEQ ID NO: 146;

La molécula de unión a anti-PD-1 humana, según se define y para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, es un anticuerpo humanizado.

5 La molécula de unión a anti-PD-1 humana, como se define y para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147.

10 La molécula de unión a anti-PD-1 humana, según se define y para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:153.

15 La invención se refiere además a las realizaciones de todas estas moléculas de unión a anti-PD-1 humana, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, en donde la molécula comprende una Región Fc, y en donde la Región Fc es una Región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la Región Fc variante para un FcγR y/o mejora la vida media en suero, y más particularmente, en donde las modificaciones comprenden por lo menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

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

25 en donde la numeración es la del índice EU como en Kabat.

30 La invención se refiere además a las realizaciones en los que cualquiera de las moléculas de unión a PD-1 descritas anteriormente, según se define y para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, se usa para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T. La invención se refiere además a las realizaciones en los 35 que cualquiera de las moléculas de unión a PD-1 descritas anteriormente se usa en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un sistema inmunitario suprimido, especialmente cáncer o una infección.

35 La invención se refiere particularmente a dicho uso en el tratamiento o diagnóstico o pronóstico del cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por la presencia de una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste de una célula de: un tumor de la glándula suprarrenal, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, tumores del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello uterino, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de células renales cromófobas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor desmoplásico de células 40 redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ossium de fibrogénesis imperfecta, una displasia fibrosa de hueso, un cáncer de vesícula biliar o de vías biliares, un cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, 45 carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, 50 un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroides, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina nerviosa periférica, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un 55 rhabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejidos blandos, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides y un cáncer de útero.

55 La invención se refiere particularmente a dicho uso en el tratamiento o diagnóstico o pronóstico de cáncer, en donde el cáncer es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de recto, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda B (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), linfomas no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica o linfoma de Burkitt.

60 Cualquiera de las moléculas de unión a PD-1 descritas anteriormente se puede marcar detectablemente y se usa en la detección de PD-1.

**Breve descripción de los dibujos**

- 5 La **Figura 1** proporciona un esquema de un diacuerpo unido covalentemente representativo que tiene dos sitios de unión a epítopo compuestos por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene un dominio promotor de heterodímero en espiral E o espiral K. Un residuo de cisteína puede estar presente en un conector y/o en el dominio promotor de heterodímero como se muestra en la **Figura 3B**. Los dominios de VL y VH que reconocen el mismo epítopo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.
- 10 La **Figura 2** proporciona un esquema de una molécula de diacuerpo unida covalentemente representativa que tiene dos sitios de unión a epítopo compuestos por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene un dominio CH2 y CH3, de tal manera que las cadenas asociadas forman todo o parte de una región Fc. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítopo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.
- 15 Las **Figuras 3A-3C** proporcionan esquemas que muestran diacuerpos tetravalentes representativos que tienen cuatro sitios de unión a epítopos compuestos por dos pares de cadenas polipeptídicas (es decir, cuatro cadenas polipeptídicas totales). Un polipéptido de cada par posee un dominio CH2 y CH3, de tal manera que las cadenas asociadas forman todo o parte de una región Fc. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítopo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno. Los dos pares de cadenas polipeptídicas pueden ser iguales. Cuando los dominios VL y VH reconocen diferentes epítopos (como se muestra en las **Figuras 3A-3C**), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión al epítopo y es biespecífica y bivalente con respecto a cada epítopo unido. Cuando los dominios VL y VH reconocen el mismo epítopo (por ejemplo, se usan las mismas CDR del dominio VL y las mismas CDR del dominio VH en ambas cadenas), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión a epítopo y es monoespecífica y tetravalente con respecto a un único epítopo. Alternativamente, los dos pares de polipéptidos pueden ser diferentes. Cuando los dominios de VL y VH de cada par de polipéptidos reconocen diferentes epítopos (como se muestra en las **Figuras 3A-3C**), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión a epítopo y es tetraespecífica y monovalente con respecto a cada epítopo unido. La **Figura 3A** muestra un diacuerpo Fc que contiene un dominio promotor de heterodímero peptídico que comprende un residuo de cisteína. La **Figura 3B** muestra un diacuerpo que contiene la región Fc, que contiene dominios promotores de heterodímeros en espiral E y espiral K que comprenden un residuo de cisteína y un conector (con un residuo de cisteína opcional). La **Figura 3C**, muestra un diacuerpo que contiene la región Fc, que contiene los dominios CH1 y CL del anticuerpo.
- 20 30 La **Figuras 4A y 4B** proporcionan esquemas de una molécula de diacuerpo unida covalentemente representativa que tiene dos sitios de unión a epítopo compuestos por tres cadenas polipeptídicas. Dos de las cadenas polipeptídicas poseen un dominio CH2 y CH3, de tal manera que las cadenas asociadas forman todo o parte de una región Fc. Las cadenas polipeptídicas que comprenden los dominios VL y VH comprenden además un dominio promotor de heterodímeros. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítopo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.
- 35 40 La **Figura 5** proporciona los esquemas de una molécula de diacuerpo unida covalentemente representativa que tiene cuatro sitios de unión a epítopo compuestos por cinco cadenas polipeptídicas. Dos de las cadenas polipeptídicas poseen un dominio CH2 y CH3, de tal manera que las cadenas asociadas forman una región Fc que comprende toda o parte de una región Fc. Las cadenas polipeptídicas que comprenden los dominios VL y VH enlazados comprenden además un dominio promotor de heterodímeros. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítopo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.
- 45 50 Las **Figuras 6A-6F** proporcionan esquemas de moléculas de unión trivalentes que contienen Región Fc representativas que tienen tres sitios de unión a epítopos. Las **Figuras 6A y 6B**, respectivamente, ilustran esquemáticamente los dominios de moléculas de unión trivalentes que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo y un dominio de unión de tipo Fab que tiene diferentes orientaciones de dominio en los que los dominios de unión de tipo diacuerpo son N-terminales o C-terminales para una Región Fc. Las moléculas en las **Figuras 6A y 6B** comprenden cuatro cadenas. Las **Figuras 6C y 6D**, respectivamente, ilustran esquemáticamente los dominios de moléculas de unión trivalentes que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo N-terminales a una Región Fc, y un dominio de unión de tipo Fab en el que la cadena ligera y la cadena pesada están enlazadas mediante un espaciador polipeptídico o un dominio de unión de tipo scFv. Las moléculas de unión trivalentes en las **Figuras 6E y 6F**, respectivamente ilustran esquemáticamente los dominios de moléculas de unión trivalentes que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo C-terminales a una Región Fc, y un dominio de unión de tipo Fab enlazado, o un dominio de unión de tipo scFv en el que los dominios de unión de tipo diacuerpo son. Las moléculas de unión trivalentes en las **Figuras 6C-6F** comprenden tres cadenas. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítopo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.
- 55 60 Las **Figuras 7A-7D** muestran que los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se unen a PD-1 humana. Las curvas de unión para la unión a shPD-1-His se muestran en la **Figura 7A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4 y PD-
- 65

1 mAb 9), la **Figura 7B** (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6 y PD-1 mAb 7), y la **Figura 7C** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 y PD-1 mAb 15). Las curvas de unión para la unión a shPD-1-Fc humano se muestran en la **Figura 7D** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 y PD-1 mAb 15).

5 Las **Figuras 8A-8C** muestran que los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se unen a PD-1 de mono cynomolgus. Las curvas de unión para la unión a scynoPD-1-hFc se muestran en la **Figura 8A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7), la **Figura 8B** (PD-1 mAb 9) y la **Figura 8C** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 y PD-1 mAb 15).

10 10 Las **Figuras 9A-9D** muestran la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 para bloquear la unión de PD-L1 humana a PD-1 humana. Las curvas de inhibición se muestran en la **Figura 9A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 15 y PD-1 mAb A), la **Figura 9B** (PD-1 mAb 4), la **Figura 9C** (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7 y PD-1 mAb A), y la **Figura 9D** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, PD-1 mAb 15 y PD-1 mAb A).

15 20 Las **Figuras 10A-10B** muestran la especificidad de tejido del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7. La **Figura 10A** muestra tinciones histológicas de tejido de colon normal (**paneles i y vii**), hígado (**Paneles ii y viii**), pulmón (**paneles iii y ix**), páncreas (**Paneles iv y x**), riñón (**paneles v y xii**) y el corazón (**Paneles vi y xii**). La **Figura 10A, paneles i-vi** muestran los resultados del tejido incubado con PD-1 mAb 7 marcado (0,313 µg/ml). La **Figura 10A, paneles vii-xii** muestran los resultados del tejido incubado con mAb de control de isotipo marcado (0,314 µg/ml). La **Figura 10B** muestra tinciones histológicas de piel (**paneles i y iv**), amígdalas (**paneles ii y v**) y células NSO que expresan PD-1 (**paneles iii y vi**). La **Figura 10B, paneles i-iii** muestran los resultados del tejido incubado con PD-1 mAb 7 marcado (0,313 µg/ml).

25 30 La **Figura 11** muestra los perfiles de unión de anticuerpos anti-PD-1 humana humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.1), hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1) y anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B que tienen IgG1 (AA) o IgG4 (P) para unirse a PD-1 de superficie celular.

35 35 Las **Figuras 12A-12B** muestran la capacidad de los anticuerpos anti-PD humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.1), hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1) y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B, que tienen IgG1 (AA) o IgG4 (P) para bloquear la unión de PD-L1 humana soluble (**Figura 12A**) y PD-L2 humana soluble (**Figura 12B**) a la PD-1 humana de la superficie celular.

40 45 La **Figura 13** muestra la capacidad de los anticuerpos anti-PD humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.1), hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1) y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B, que tienen IgG1 (AA) o IgG4 (P) para antagonizar el eje PD-1/PD-L1 al bloquear la interacción PD-1/PD-L1 y prevenir la regulación por disminución de respuestas de células T en un ensayo informador de luciferasa Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1.

50 55 La **Figura 14** muestra que PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles comparables o superiores a los anticuerpos anti-PD-1 referenciados (PD-1 mAb A y PD-1 mAb B) y que el tratamiento con PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 en combinación con LAG-3 mAb 1 proporcionó la mayor mejora de la liberación de citoquinas. Los perfiles de secreción de IFNy de PBMC estimuladas con enterotoxina B *Staphylococcal* (SEB) tratadas con anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación.

60 65 Las **Figuras 15A-15B** muestran la capacidad de los anticuerpos anti-PD humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1) y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B, que tienen IgG1 (AA) o IgG4 (P) para estimular la producción de citoquinas. Perfiles de secreción de IFNy (**Figura 15A**) y TNFa (**Figura 15B**), de PBMC estimuladas con SEB tratadas con anticuerpos anti-PD-1.

70 75 Las **Figuras 16A-16B** muestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART A, DART D, DART E, DART F, DART G y DART H, son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles comparables o superiores a los observados con la administración del combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A), y que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART A, DART D, DART E, DART F y DART G proporcionaron la mejora más grande en la liberación de citoquinas. Se representan los perfiles de secreción de IFNy de PBMC estimuladas con una concentración baja de SEB (0,2 ng/ml tratado con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación. Los resultados usando PBMC de dos donantes representativos se muestran en la **Figura 16A** y la **Figura 16B**.

80 85 Las **Figuras 17A-17B** muestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART A, DART B y DART C son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles más altos que los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Se

representan perfiles de secreción de IFNy de PBMC de dos donantes representativos, estimulados con una concentración alta de SEB (85 ng/ml) tratados con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación. Los resultados usando PBMC de dos donantes representativos se muestran en la **Figura 17A** y la **Figura 17B**.

5 Las **Figuras 18A-18B** muestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART A, DART B y DART C son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles más altos que los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Se representan los perfiles de secreción de IFNy de PBMC de dos donantes representativos, estimulados con una concentración media de SEB (0,5 ng/ml) tratados con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación. Los resultados usando PBMC de dos donantes representativos se muestran en la **Figura 18A** y la **Figura 18B**.

10 15 La **Figura 19** muestra que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART D y DART H son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles comparables o superiores a los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A), y que DART D proporcionó la mejora más alta de liberación de citoquinas. Se representan los perfiles de secreción de IL-2 de PBMC de un donante representativo estimulado con una alta concentración de SEB (85 ng/ml) tratado con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación.

20 25 30 La **Figura 20** muestra que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART B y DART I son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles más altos que los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A, hPD-1 mAb 7 (1,2) + hLAG-3 mAb 1 (1,4), hPD-1 mAb 7 (1,2) + hLAG-3 mAb 6 (1,1)). Se representan los perfiles de secreción de IFNy de PBMC de un donante representativo, estimulado con una concentración media de SEB (0,5 ng/ml) tratados con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación.

35 40 45 50 Las **Figuras 21A-21D** muestran que el diacuerpo biespecífico PD-1 x LAG-3 DART I es capaz de estimular la producción de citoquinas a niveles más altos que los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Se representan los perfiles de secreción de IFNy (**Figuras 21A** y **21C**) e IL-2 (**Figuras 21B** y **21D**) de células de memoria CD4 de dos donantes representativos, estimulados con toxoide tetánico (5 µg/ml) tratados con el diacuerpo biespecífico PD-1 x LAG-3 DART-I, anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 en combinación, o un control de isotypio. Los resultados en el día 7 usando células T de memoria CD4 de dos donantes representativos se muestran en las **Figuras 21A-B** y las **Figuras 21C-D**.

55 60 65 La **Figura 22** muestra que la farmacocinética de la molécula biespecífica PD-1 x LAG-3, DART I es comparable a la del anticuerpo anti-PD-1, PD-1 mAb A IgG4 (P) en mono cynomolgus. Las líneas indican la concentración sérica media de DART I (sólido) y PD-1 mAb A (discontinuo). Los valores individuales para los monos macho (relleno) y hembra (abierto) se representan para DART I (triángulos) y PD-1 mAb A (círculos).

70 75 80 85 90 Las **Figuras 23A-23C** muestran las concentraciones de anticuerpos en suero y el porcentaje de PD-1 unido en la superficie de las células T CD4+ o CD8+ a lo largo del tiempo en animales después del tratamiento con diferentes anticuerpos anti-PD-1. El porcentaje de PD 1 unida en la superficie de las células T CD4+ o CD8+ después del tratamiento con mAb anti-PD 1 se representa en los ejes y derechos; los símbolos representan el % de PD1 unida en las células T para cada animal individual y las líneas discontinuas representan los valores medios. Las concentraciones séricas de mAb se representan en el eje y izquierdo; los símbolos representan los niveles séricos de cada animal individual y las líneas continuas representan ajustes no lineales de los datos. Cada panel presenta datos para animales (n = 1/sexo/grupo) administrados 10 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) (**Figura 23A**), PD-1 mAb A IgG4 (P) (**Figura 23B**), o PD-1 mAb B IgG4 (P) (**Figura 23B**) por infusión intravenosa el día 1.

#### 55 Descripción detallada de la invención

90 Moléculas de unión a PD-1 que comprenden el dominio de unión a PD-1 de anticuerpos anti-PD-1 seleccionados capaces de unirse tanto a PD-1 de mono cynomolgus como a PD-1 humana: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, se divulan, pero no se reivindican en el presente documento. La invención se refiere a moléculas de unión a PD-1 que son anticuerpos humanizados, en los que el anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana comprende un dominio de cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147 y un dominio de cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6. La presente invención se dirige a tales moléculas de unión a PD-1 para su uso en métodos de estimulación de una respuesta inmunitaria. En particular, la presente invención se dirige a tales moléculas de unión a

PD-1 para su uso en métodos de terapia de combinación en los que una molécula de unión a PD-1 que comprende uno o más dominio(s) de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 seleccionados, según se definen y para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, se administra en combinación con una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria y/o en combinación con una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno de cáncer.

#### 5 I. Anticuerpos y sus dominios de unión

10 Anticuerpos son moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse específicamente a un objetivo, como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de por lo menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en el dominio variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, los términos "**anticuerpo**" y "**anticuerpos**" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos químéricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs biespecíficos enlazados con disulfuro (sdFv), intracuerpos y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) o subclase. Además de sus usos conocidos en el diagnóstico, se ha demostrado que los anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos. Los anticuerpos son capaces de unirse inmunoespecíficamente a un polipéptido o proteína o una molécula no proteica debido a la presencia en dicha molécula de un dominio o fracción o conformación particular (un "epítopo"). Una molécula que contiene un epítopo puede tener actividad inmunogénica, de tal manera que provoque una respuesta de producción de anticuerpos en un animal; tales moléculas se denominan "**antígenos**"). Las últimas décadas han visto un resurgimiento del interés en el potencial terapéutico de los anticuerpos, y los anticuerpos se han convertido en una de las clases principales de fármacos derivados de la biotecnología (Chan, CE et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases," Singapore Med. J. 50(7):663-666). Se han aprobado para su uso o están en desarrollo más de 200 fármacos basados en anticuerpos.

30 El término "**anticuerpo monoclonal**" se refiere a una población de anticuerpos homogénea en la que el anticuerpo monoclonal está compuesto por aminoácidos (de origen natural y no natural) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo epítopo (o sitio antigénico). El término "anticuerpo monoclonal" abarca no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (como Fab, Fab', 35 F(ab')<sub>2</sub>Fv), de cadena sencilla (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales químéricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad y capacidad requeridas para unirse a un antígeno. No se pretende que esté limitado con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en que se elabora (por ejemplo, por hibridoma, selección de fagos, expresión 40 recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas, así como fragmentos, etc. descritos anteriormente bajo la definición de "anticuerpo". En la técnica se conocen métodos para elaborar anticuerpos monoclonales. Un método que puede emplearse es el método de Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", Nature 256:495-497 o una modificación del mismo. Típicamente, los anticuerpos monoclonales se desarrollan en ratones, ratas o conejos. Los anticuerpos se 45 producen inmunizando a un animal con una cantidad inmunogénica de células, extractos de células o preparaciones de proteínas que contienen el epítopo deseado. El inmunógeno puede ser, pero no se limita a, células primarias, líneas celulares cultivadas, células cancerosas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o tejido. Las células usadas para la inmunización pueden cultivarse durante un período de tiempo (por ejemplo, por lo menos 24 horas) antes de su uso como inmunógeno. Las células pueden usarse como inmunógenos por sí mismas o en combinación con un 50 adyuvante no desnaturalizante, como Ribi (ver, por ejemplo, Jennings, VM (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production", ILAR J. 37 (3): 119-125). En general, las células deben mantenerse intactas y preferiblemente viables cuando se usan como inmunógenos. Las células intactas pueden permitir que el animal inmunizado detecte mejor los antígenos que las células rotas. El uso de adyuvantes desnaturalizantes o agresivos, por ejemplo, adyuvante de Freud, puede romper las células y, por lo tanto, se desaconseja. El inmunógeno puede 55 administrarse varias veces a intervalos periódicos, como cada dos semanas o semanalmente, o puede administrarse de tal manera que se mantenga la viabilidad en el animal (por ejemplo, en un tejido recombinante). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales existentes y cualquier otro anticuerpo equivalente que sea inmunoespecífico para un epítopo patógeno deseado pueden secuenciarse y producirse de manera recombinante mediante cualquier medio conocido en la técnica. Un anticuerpo puede secuenciarse y la secuencia polinucleotídica clonarse en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede luego expandirse y congelarse para uso futuro. La secuencia de polinucleótidos de tales anticuerpos puede usarse para manipulación genética para generar moléculas monoespecíficas o multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas, triespecíficas y tetraespecíficas) de la divulgación 60 así como un anticuerpo químérico, un anticuerpo humanizado y/o un anticuerpo caninizado optimizados por afinidad, para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. El principio general en la humanización de un 65

anticuerpo implica retener la secuencia básica de la porción del anticuerpo que se une al antígeno, mientras se intercambia el resto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpos humanos.

5 Los anticuerpos naturales (como los anticuerpos IgG) se componen de dos **cadenas ligeras** complejadas con dos **cadenas pesadas**. Cada cadena ligera contiene un dominio variable (**VL**) y un dominio constante (**CL**). Cada cadena pesada contiene un dominio variable (**VH**), tres dominios constantes (**CH1**, **CH2** y **CH3**) y un dominio bisagra localizado entre los dominios **CH1** y **CH2**. La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas de origen natural (por ejemplo, IgG) es, por tanto, un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, habitualmente expresado como una glicoproteína de aproximadamente 150.000 Da. La porción amino-terminal ("N-terminal") de cada cadena incluye un Dominio Variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal ("C-terminal") de cada cadena define una región constante, con cadenas ligeras que tienen un único dominio constante y cadenas pesadas que habitualmente tienen tres dominios constantes y un dominio bisagra. Por tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-VL-CL-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (donde H es el dominio bisagra, y n y c representan, respectivamente, el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido). Los dominios variables de una molécula de IgG consisten de las regiones determinantes de la complementariedad (**CDR**), que contienen los residuos en contacto con el epítopo, y segmentos no CDR, denominados segmentos marco (**IFR**), que en general mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los giros de CDR para permitir tal contacto (aunque ciertos residuos marco también pueden entrar en contacto con el antígeno). Por tanto, los dominios **VL** y **VH** tienen la estructura n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c. Los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda y tercera CDR de una cadena ligera de anticuerpo están designados en la presente respectivamente **dominio de CDR<sub>L1</sub>**, **dominio de CDR<sub>L2</sub>**, y **dominio de CDR<sub>L3</sub>**. De manera similar, los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda y tercera CDR de una cadena pesada de anticuerpo se designan en la presente respectivamente **dominio de CDR<sub>H1</sub>**, **dominio de CDR<sub>H2</sub>**, y **dominio de CDR<sub>H3</sub>**. Por tanto, los términos dominio de **CDR<sub>L1</sub>**, dominio de **CDR<sub>L2</sub>**, dominio de **CDR<sub>L3</sub>**, dominio de **CDR<sub>H1</sub>**, dominio de **CDR<sub>H2</sub>** y dominio de **CDR<sub>H3</sub>** se dirigen a polipéptidos que cuando se incorporan a una proteína hacen que esa proteína sea capaz de unirse a un epítopo específico independientemente de si dicha proteína es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas o un diacuerpo o una molécula de unión de cadena sencilla (por ejemplo, un scFv, un BiTe, etc.), o es otro tipo de proteína. Por consiguiente, como se usa en la presente, el término **"fragmento de unión a epítopo"** significa un fragmento de un anticuerpo capaz de unirse inmunoespecíficamente a un epítopo, y el término **"sitio de unión a epítopo"** se refiere a la porción de una molécula que comprende un fragmento de unión al epítopo que es responsable de la unión al epítopo. Un sitio de unión a epítopo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o los 6 dominios de CDR de dicho anticuerpo y, aunque es capaz de unirse inmunoespecíficamente a dicho epítopo, puede mostrar una inmunoespecificidad, afinidad o selectividad hacia dicho epítopo que difiere de la de dicho anticuerpo. Sin embargo, preferiblemente, un fragmento de unión a epítopo contendrá los 6 dominios de CDR de dicho anticuerpo. Un fragmento de unión a epítopo de un anticuerpo puede ser una única cadena polipeptídica (por ejemplo, un scFv), o puede comprender dos o más cadenas polipeptídicas, cada una con un extremo terminal amino y un extremo terminal carboxi (por ejemplo, un diacuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, etc.).

40 Los fragmentos de dominio variable de cadena sencilla se preparan enlazando el dominio variable de cadena ligera y/o pesada usando un péptido de enlace corto. Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426) describe un ejemplo de péptidos de enlace que forman un puente de aproximadamente 3,5 nm entre el extremo terminal carboxi de un dominio variable y el extremo terminal amino del otro dominio variable. Se han diseñado y usado conectores de otras secuencias (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426). A su vez, los conectores pueden modificarse para funciones adicionales, como la unión de fármacos o la unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena sencilla pueden producirse de manera recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contenga el polinucleótido que codifica el scFv en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, como células de levadura, vegetales, de insectos o de mamíferos, o procariotas, como E. coli. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden elaborarse mediante manipulaciones rutinarias como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en la técnica.

55 El término anticuerpo **"humanizado"** se refiere a una molécula químérica, preparada generalmente usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión al antígeno de una inmunoglobulina de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina restante de la molécula que se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos anti-PD-1 humana incluyen variantes humanizadas, químéricas o caninizadas de anticuerpos PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15. La secuencia de polinucleótidos de los dominios variables de tales anticuerpos puede usarse para manipulación genética para generar tales derivados y mejorar la afinidad u otras características de tales anticuerpos. El principio general en la humanización de un anticuerpo implica retener la secuencia básica de la porción de unión al antígeno del anticuerpo, mientras se intercambia el resto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpos humanos. Hay cuatro pasos generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estos son: (1)

5 determinar el nucleótido y la secuencia de aminoácidos predicha de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado o el anticuerpo caninizado, es decir, decidir qué región marco del anticuerpo usar durante el proceso de humanización o caninización (3) las metodologías/técnicas de humanización o caninización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 4.816.567; 5.807.715; 5,866,692; y 6.331.415.

10 El sitio de unión al antígeno puede comprender o un Dominio Variable completo fusionado a un Dominio Constante o solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicho Dominio Variable injertadas en regiones marco apropiadas. Los sitios de unión a antígenos pueden ser de tipo salvaje o estar modificados mediante una o más sustituciones de aminoácidos. Esto elimina la región constante como inmunógeno en individuos humanos, pero la posibilidad de una respuesta inmunitaria al dominio variable extraño permanece (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224). Otro enfoque se centra no solo en proporcionar regiones constantes derivadas de humanos, sino también en modificar los dominios variables y remodelarlos lo más cerca posible de la forma humana.

15 15 Se sabe que los dominios variables de las cadenas pesadas como ligera contienen tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) que se conservan relativamente en una especie determinada y que supuestamente proporcionan un andamiaje para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, los dominios variables pueden "reformarse" o "humanizarse" injertando CDR derivadas de anticuerpos no humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano que se va a modificar. La aplicación de este enfoque a varios anticuerpos se ha informado por Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; y Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154. En algunos casos, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de las CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). Alternativamente, los anticuerpos humanizados pueden tener una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que difieren en secuencia con respecto al anticuerpo original.

40 Se han descrito una serie de moléculas de anticuerpos "humanizadas" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos químéricos que tienen un dominio variable de roedor o roedor modificado y sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) asociadas fusionadas con dominios constantes humanos (ver, por ejemplo, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies," Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen," J. Immunol. 138:4534-4538, y Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody," Cancer Res. 47:3577-3583). Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región marco de soporte humano (FR) antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado (ver, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; y Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," Nature 321:522-525). Otra referencia describe las CDR de roedor soportadas por regiones marco de roedor revestidas recombinantemente. Ver, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea Nº 519.596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpos antihumanos de roedores, lo que limita la duración y la eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esas fracciones en receptores humanos. Otros métodos de humanización de anticuerpos que también pueden utilizarse 45 se divulan en Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 y en las Patentes de Estados Unidos Nº. 6.180.377; 6.054.297; 5,997,867; y 5,866,692.

50 55

60 **II. Receptores Fc (FcγRs)**

65 Los dominios CH2 y CH3 de las dos cadenas pesadas interactúan para formar la **región Fc**, que es un dominio que es reconocido por los **receptores Fc** celulares, incluyendo pero no limitados a, los receptores gamma Fc (**FcγR**). Como se usa en la presente, el término "Región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG1 humana ejemplar es (SEQ

# ES 2 994 122 T3

**ID NO: 1):**

	231	240	250	260	270	280
5	APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHE D PEVKFNWYVD					
	290	300	310	320	330	
10	GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA					
	340	350	360	370	380	
15	PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE					
	390	400	410	420	430	
20	WESNGQPENN YKTPPPVLD S DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE					
	440	447				
	ALHNHYTQKS LSLSPG <u>X</u>					

25 numerado por el índice EU como se expone en Kabat, en donde X es una lisina (K) o está ausente.

La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG2 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 2):**

30	231	240	250	260	270	280
	APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHE D PEVKFNWYVD					
35	290	300	310	320	330	
	GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA					
40	340	350	360	370	380	
	PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE					
45	390	400	410	420	430	
	WESNGQPENN YKTPPPMLDS DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE					
	440	447				
50	ALHNHYTQKS LSLSPG <u>X</u>					

numerado por el índice EU como se expone en Kabat, en donde X es una lisina (K) o está ausente.

La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG3 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 3):**

60

65

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD					
5	290	300	310	320	330
GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA					
10	340	350	360	370	380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE					
15	390	400	410	420	430
WESSGQPENN YNTTPPM LDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE					
20	440	447			
ALHNRFTQKS LSLSPG <u>X</u>					

numerado por el índice EU como se expone en Kabat, en donde **X** es una lisina (K) o está ausente.

25 La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG4 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 4**):

231	240	250	260	270	280
APEFLGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD					
30	290	300	310	320	330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS					
35	340	350	360	370	380
SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE					
40	390	400	410	420	430
WESNGQPENN YKTTPPVLD S DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE					
45	440	447			
ALHNHYTQKS LSLSLG <u>X</u>					

50 numerado por el índice EU como se expone en Kabat, en donde **X** es una lisina (K) o está ausente.

55 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos en la región constante de una cadena pesada de IgG es la del índice EU como en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) ("Kabat"), expresamente. El término "Índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humana. Los aminoácidos de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras de las inmunoglobulinas se designan por la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para anticuerpos, identificó una secuencia de consenso de aminoácidos para cada subgrupo y asignó un número de residuo a cada aminoácido, y las CDR se identifican como se define por Kabat (se entenderá que la CDR<sub>H1</sub> como se define por Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins,". J. Mol. Biol. 196:901-917) empieza cinco residuos antes). El esquema de numeración de Kabat es extensible a los anticuerpos no incluidos en su compendio alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat por referencia a los aminoácidos conservados. Este método para asignar números de residuos se ha convertido en estándar en el campo e identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos, incluyendo variantes químicas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de un anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de un

anticuerpo de ratón.

Se han observado polimorfismos en una serie de posiciones diferentes dentro de las regiones constantes del anticuerpo (por ejemplo, posiciones CH1, incluyendo pero no limitadas a, las posiciones 192, 193 y 214; posiciones de Fc, incluyendo pero no limitadas a,, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356 y 358 numeradas por el índice EU como se expone en Kabat), y por lo tanto pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias en el estado de la técnica. Las formas polimórficas de inmunoglobulinas humanas se han caracterizado bien. En la actualidad se conocen 18 alotipos Gm: G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation." Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Se contempla específicamente que los anticuerpos de la presente invención, tal como se define y para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, pueden incorporar cualquier alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina, y no se limitan al alotipo, isoalotipo o haplotipo de las secuencias proporcionadas en la presente. Además, en algunos sistemas de expresión, el residuo de aminoácido C-terminal (en negrita arriba) del dominio CH3 puede eliminarse posttraduccionalmente. Por consiguiente, el residuo C-terminal del dominio CH3 es un residuo de aminoácido opcional en las moléculas de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6. Específicamente incluidas por la presente divulgación están las moléculas de unión a PD-1 que carecen del residuo C-terminal del dominio CH3. También se incluyen específicamente en la presente divulgación tales constructos que comprenden el residuo de lisina C-terminal del dominio CH3.

Las señales activadoras e inhibidoras se transducen mediante la ligación de una región Fc a un receptor gamma Fc celular (FcγR). La capacidad de tal ligación para dar como resultado funciones diametralmente opuestas resulta de diferencias estructurales entre los diferentes FcγR. Dos dominios distintos dentro de los dominios de señalización citoplasmática del receptor denominados motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAM) y motivos inhibidores de inmunorreceptores basados en tirosina (ITIM) explican las diferentes respuestas. El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas en estas estructuras dicta el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, mientras que los complejos que contienen ITIM solo incluyen FcγRIIB. Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. La agrupación de FcγRIIA mediante inmunocomplejos o reticulación de anticuerpos específicos sirve para agregar ITAM junto con quinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, cuya activación da como resultado la activación de sustratos en sentido descendente (por ejemplo, PI<sub>3</sub>K). La activación celular lleva a la liberación de mediadores proinflamatorios. El gen FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es un 96% idéntico al de FcγRIIA y se une a los complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplasmático de FcγRIIB define esta subclase inhibidora de FcγR. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se coliga junto con un FcγR activador, el ITIM en FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, evitando en consecuencia la entrada de Ca<sup>++</sup> intracelular. Por tanto, la reticulación de FcγRIIB amortigua la respuesta de activación al ligamiento de FcγR e inhibe la capacidad de respuesta celular. Por tanto, se interrumpe la activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos.

La capacidad de un anticuerpo para unirse a un epítopo de un antígeno depende de la presencia y secuencia de aminoácidos de los dominios VL y VH del anticuerpo. La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y, en particular, la interacción de sus dominios VL y VH forma uno de los dos sitios de unión al epítopo de un anticuerpo natural. Los anticuerpos naturales son capaces de unirse a una sola especie de epítopo (es decir, son monoespecíficos), aunque pueden unirse a múltiples copias de esa especie (es decir, mostrando bivalencia o multivalencia).

Los dominios de unión un anticuerpo se unen a epítopos de una manera "**inmunoespecífica**". Como se usa en la presente, se dice que un anticuerpo, diacuerpo u otra molécula de unión a epítopo se une "**inmunoespecíficamente**" a una región de otra molécula (es decir, un epítopo) si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con ese epítopo con respecto a epítopos alternativos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítopo viral es un anticuerpo que se une a este epítopo viral con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une inmunoespecíficamente a otros epítopos virales o epítopos no virales. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o fracción o epítopo) que se une inmunoespecíficamente a un primer objetivo puede unirse o no específica o preferentemente a un segundo objetivo. Como tal, la "**unión inmunoespecífica**" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión "**específica**". Se dice que dos moléculas son capaces de unirse entre sí de manera "**fisioespecífica**", si tal unión presenta la especificidad con la que los receptores se unen a sus ligandos respectivos.

La funcionalidad de los anticuerpos puede mejorarse generando moléculas multiespecíficas basadas en

anticuerpos que puedan unirse simultáneamente a dos antígenos separados y distintos (o diferentes epítopos del mismo antígeno) y/o generando una molécula basada en anticuerpos que tenga una mayor valencia (es decir, más de dos sitios de unión) para el mismo epítopo y/o antígeno.

5 Para proporcionar moléculas que tengan mayor capacidad que los anticuerpos naturales, se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes (ver, por ejemplo, Publicaciones de PCT Nº WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), la mayoría de los cuales usan péptidos conectores para fusionar un fragmento de unión a epítopo adicional (por ejemplo, un scFv, VL, VH, etc.) al núcleo del anticuerpo o dentro del mismo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), o para fusionar múltiples fragmentos de unión a epítopos (por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv). Los formatos alternativos usan péptidos conectores para fusionar un fragmento de unión a epítopo (por ejemplo, un scFv, VL, VH, etc.) a un dominio de dimerización como el dominio CH2-CH3 o polipéptidos alternativos (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Típicamente, estos enfoques implican compromisos y compensaciones. Por ejemplo, las Publicaciones de PCT Nº 10 WO 2013/174873, WO 2011/133886 y WO 2010/136172 divultan que el uso de conectores puede provocar problemas en entornos terapéuticos, y enseña un anticuerpo triespecífico en el que los dominios CL y CH1 se intercambian de sus respectivas posiciones naturales y los dominios VL y VH se han diversificado (WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitirles unirse a más de un antígeno. Por tanto, las moléculas divulgadas 15 en estos documentos intercambian especificidad de unión por la capacidad de unirse a especies de antígenos adicionales. Las Publicaciones de PCT Nº WO 2013/163427 y WO 2013/119903 divultan la modificación del dominio CH2 para que contenga un aducto de proteína de fusión que comprende un dominio de unión. El documento indica que el dominio CH2 probablemente solo desempeña un papel mínimo en la mediación de la función efectora. Las Publicaciones de PCT Nº WO 2010/028797, WO2010028796 y WO 2010/028795 divultan anticuerpos 20 recombinantes cuyas regiones Fc han sido reemplazadas con dominios VL y VH adicionales, para formar moléculas de unión trivalentes. Las Publicaciones de PCT Nº. WO 2003/025018 y WO2003012069 divultan diacuerpos recombinantes cuyas cadenas individuales contienen dominios scFv. La Publicación de PCT Nº WO 2013/006544 25 divulgua moléculas Fab multivalentes que se sintetizan como una única cadena polipeptídica y luego se someten a proteólisis para producir estructuras heterodiméricas. Por tanto, las moléculas divulgadas en estos documentos intercambian toda o parte de la capacidad de mediar la función efectora por la capacidad de unirse a especies de antígenos adicionales. Las Publicaciones de PCT Nº WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 30 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 y WO 1991/003493 divultan la adición de dominios de unión o grupos funcionales adicionales a un anticuerpo o una porción de anticuerpo (por ejemplo, añadir un diacuerpo a la cadena ligera del anticuerpo, o añadir dominios VL y VH adicionales a las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo, o añadir una proteína de fusión 35 heteróloga o encadenando múltiples dominios Fab entre sí). Por tanto, las moléculas divulgadas en estos documentos intercambian la estructura del anticuerpo nativa por la capacidad de unirse a especies de antígenos adicionales.

40 La técnica también ha indicado la capacidad de producir diacuerpos que difieren de tales anticuerpos naturales en ser capaces de unirse a dos o más especies de epítopos diferentes (es decir, mostrando biespecificidad o multiespecificidad además de bivalencia o multivalencia) (ver, por ejemplo, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent AndBispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor 45 Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A 50 Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944).

55 El diseño de un diacuerpo se basa en el derivado de anticuerpo conocido como fragmento de dominio variable de cadena sencilla (**scFv**). Tales moléculas se preparan enlazando dominios variables de cadena ligera y/o pesada mediante el uso de un péptido de enlace corto. Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242: 423-426) describe un ejemplo de péptidos de enlace que forman un puente de aproximadamente 3,5 nm entre el extremo terminal carboxi de un dominio variable y el extremo terminal amino del otro dominio variable. 60 Se han diseñado y usado conectores de otras secuencias (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242: 423-426). A su vez, los conectores pueden modificarse para funciones adicionales, como la unión de fármacos o la unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena sencilla pueden producirse de manera recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contenga polinucleótido que codifique el scFv en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, como células de levadura, plantas, insectos o 65

mamíferos, o procariotas, como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden prepararse mediante manipulaciones de rutina como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarlo usando técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en la técnica.

5 La provisión de diacuerpos no monoespecíficos proporciona una ventaja significativa sobre los anticuerpos, que incluye, pero no se limita a, la capacidad de co-ligar y co-localizar células que expresan diferentes epitopos. Por tanto, los diacuerpos biespecíficos tienen una amplia variedad de aplicaciones que incluyen la terapia y el inmunodiagnóstico. La biespecificidad permite una gran flexibilidad en el diseño y la modificación del diacuerpo en 10 varias aplicaciones, proporcionando una avidez mejorada por los antígenos multiméricos, la reticulación de diferentes antígenos y el direccionamiento dirigido a tipos de células específicos que dependen de la presencia de ambos antígenos objetivo. Debido a su valencia aumentada, bajas tasas de disociación y rápida depuración de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, de 50 kDa o menos), las moléculas de diacuerpos conocidas en la 15 técnica también han mostrado un uso particular en el campo de la imagenología de tumores (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*, " Protein Eng. 10:1221).

La biespecificidad de los diacuerpos ha llevado a su uso para la coligadura de células diferentes, por ejemplo, la reticulación de células T citotóxicas con células tumorales (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", Nature 314:628-631, y Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells 20 By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305; Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Alternativa, o adicionalmente, pueden usarse diacuerpos biespecíficos para coligar receptores en la superficie de diferentes células o en una sola célula. La coligación de diferentes células y/o receptores es útil para modular las funciones efectoras y/o la 25 señalización de las células inmunes. Pueden dirigirse moléculas multiespecíficas (por ejemplo, diacuerpos biespecíficos) que comprenden sitios de unión a epitopos a un determinante de superficie de cualquier célula inmunitaria como B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70 (CD27L), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), receptor de activación 30 de asesinas (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40 (CD134), OX40L (CD134L), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2), y/o VISTA (PD-1H), que se expresan en linfocitos T, células asesinas naturales (NK), células presentadoras de antígenos u otras células mononucleares celda. En particular, Los sitios de 35 unión a epitopos dirigidos a un receptor de la superficie celular que participa en la regulación de un punto de control inmunológico (o el ligando del mismo) son útiles en la generación de moléculas de unión biespecíficas o multiespecíficas que antagonizan o bloquean la señalización inhibidora de las moléculas del punto de control inmunológico y de este modo estimulan, regulan por incremento o potencian las respuestas inmunitarias en un sujeto. Las moléculas implicadas en la regulación de los puntos de control inmunológico incluyen, pero no se limitan a, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, 40 Galectina-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 y/o VISTA.

Sin embargo, las ventajas anteriores tienen un costo destacado. La formación de tales diacuerpos no monoespecíficos requiere el ensamblaje con éxito de dos o más polipéptidos distintos y diferentes (es decir, tal formación requiere que los diacuerpos se formen mediante la heterodimerización de diferentes especies de cadenas polipeptídicas). Este hecho contrasta con los diacuerpos monoespecíficos, que se forman mediante la homodimerización de cadenas polipeptídicas idénticas. Porque deben proporcionarse por lo menos dos polipéptidos diferentes (es decir, dos especies de polipéptidos) para formar un diacuerpo no monoespecífico, y porque la homodimerización de tales polipéptidos lleva a moléculas inactivas (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588), la producción de tales polipéptidos debe lograrse de tal manera que se evite la unión covalente entre polipéptidos de la misma especie (es decir, para evitar la homodimerización) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588). Por lo tanto, la técnica ha enseñado la asociación no covalente de dichos polipéptidos (ver, por ejemplo, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor 55 Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Sin embargo, la técnica ha reconocido que los diacuerpos biespecíficos compuestos de polipéptidos asociados no covalentemente son inestables y se disocian fácilmente en monómeros no funcionales (ver, por ejemplo, Lu, D. et al. (2005) " A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. 65

Chem. 280(20):19665-19672).

A la vista de este desafío, la técnica ha tenido éxito en el desarrollo diacuerpos no monoespecíficos heterodiméricas, unidos covalentemente estables, diacuerpos denominados **DART® (Reactivos de redireccionamiento de afinidad dual)**; ver, por ejemplo, Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea Nº EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT Nº WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; y Sloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells," PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. et al. (2015) "Targeting CD123 In AML Using A T-CellDirected Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform," Blood pii: blood-2014-05-575704; Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates," Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion," J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Tales diacuerpos comprenden dos o más polipéptidos complejados covalentemente e implican manipular uno o más residuos de cisteína en cada una de las especies polipeptídicas empleadas que permiten que se formen enlaces disulfuro y de ese modo enlazar covalentemente dos cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, se ha demostrado que la adición de un residuo de cisteína al extremo C terminal de tales constructos permite el enlace de disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, estabilizando el heterodímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente.

Cada uno de los dos polipéptidos del diacuerpo **DART®** biespecífico más simple comprende tres dominios. El primer polipéptido comprende (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2), y (iii) un tercer dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y un dominio promotor de heterodímero que sirve para promover la heterodimerización con el segundo polipéptido del diacuerpo y unir covalentemente el primer y el segundo polipéptidos del diacuerpo entre sí. El segundo polipéptido contiene (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un tercer dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y un dominio promotor de heterodímero complementario que forma complejos con el dominio promotor de heterodímero de la primera cadena polipeptídica para promover la heterodimerización con la primera cadena polipeptídica. El residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) del tercer dominio de la segunda cadena polipeptídica sirve para promover el enlace covalente de la segunda cadena polipeptídica con la primera cadena polipeptídica del diacuerpo. Tales moléculas son estables, potentes y tienen la capacidad de unirse simultáneamente a dos o más antígenos. Los terceros dominios del primer y el segundo polipéptidos contienen cada uno un residuo de cisteína, la **Figura 1** proporciona un esquema de dicho diacuerpo, que utiliza dominios promotores de heterodímero de E-coil/K-coil y un conector que contiene cisteína para la unión covalente. Como se proporciona en la **Figura 2** y las **Figuras 3A-3C**, uno o ambos polipéptidos pueden poseer adicionalmente la secuencia de un dominio CH2-CH3, de tal manera que la formación de complejos entre los dos polipéptidos del diacuerpo forma una región Fc que es capaz de unirse al receptor Fc de las células (como los linfocitos B, células dendríticas, células asesinas naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos). Como se proporciona con más detalle a continuación, no es necesario que los dominios CH2 y/o CH3 de tales cadenas polipeptídicas tengan idéntica secuencia, y ventajosamente se modifican para fomentar la formación de complejos entre las dos cadenas polipeptídicas.

Se han descrito muchas variaciones de tales moléculas (ver, por ejemplo, Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053 y 2009/0060910; Publicación de Patente Europea Nº EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT Nº WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Estos diacuerpos **DART®** que contienen la región Fc pueden comprender dos parejas de cadenas polipeptídicas. La primera cadena polipeptídica comprende (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2), (iii) un tercer dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y sirve para promover la heterodimerización con el segundo polipéptido del diacuerpo y para unir covalentemente el primer y el segundo polipéptidos del diacuerpo entre sí, y (iv) un dominio CH2-CH3. El segundo polipéptido contiene (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un tercer dominio que contiene un residuo de cisteína (o

un dominio que contiene cisteína) y un dominio promotor de heterodímero que promueve la heterodimerización con la primera cadena polipeptídica. Aquí, los dos primeros polipéptidos forman un complejo entre sí para formar una región Fc. Las **Figuras 3A-3C** proporcionan esquemas de tres variaciones de tales diacuerpos usando diferentes dominios promotores de heterodímeros.

5 Otros diacuerpos DART® que contienen la región Fc pueden comprender tres cadenas polipeptídicas. El primer polipéptido de tales diacuerpos DART® contiene tres dominios: (i) un dominio que contiene VL1, (ii) un dominio que contiene VH2 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. El segundo polipéptido de tales diacuerpos DART® contiene: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena polipeptídica del diacuerpo. El tercer polipéptido de tales diacuerpos DART® comprende una secuencia CH2-CH3. Por tanto, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos DART® se asocian para formar un sitio de unión de VL1/VH1 que es capaz de unirse al epítopo, así como un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítopo. Tales moléculas de DART® más complejas también poseen dominios que contienen cisteína que funcionan para formar un complejo enlazado covalentemente. Por tanto, el primer y el segundo polipéptidos se unen entre sí mediante un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína en sus respectivos terceros dominios. En particular, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas forman complejos entre sí para formar una región Fc que se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Las **Figuras 4A-4B** proporcionan esquemas de tales diacuerpos que comprenden tres cadenas polipeptídicas.

20 Otros diacuerpos DART® que contienen la región Fc más pueden comprender cinco cadenas polipeptídicas que pueden comprender las regiones de unión de los dominios variables de cadena ligera y pesada de hasta tres inmunoglobulinas diferentes (a las que se hace referencia como VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3). Por ejemplo, la primera cadena polipeptídica de tales diacuerpos puede contener: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La segunda y quinta cadenas polipeptídicas de dichos diacuerpos pueden contener: (i) un dominio que contiene VL1 y (ii) un dominio que contiene CL. La tercera cadena polipeptídica de tales diacuerpos puede contener: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1, (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3, (iv) un dominio que contiene VL2, (v) un dominio que contiene VH3 y (vi) un dominio promotor de heterodímeros, donde los dominios promotores de heterodímeros promueven la dimerización de la tercera cadena con la cuarta cadena. El cuarto polipéptido de tales diacuerpos puede contener: (i) un dominio que contiene VL3, (ii) un dominio que contiene VH2 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo. Aquí, el primer y el tercer polipéptidos forman un complejo entre sí para formar una región Fc. Tales moléculas DART® más complejas también poseen dominios que contienen cisteína que funcionan para formar un complejo unido covalentemente, de tal manera que cada cadena polipeptídica se une a por lo menos una cadena polipeptídica de adición a través de un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína. Preferiblemente, tales dominios se ordenan en la dirección N-terminal a C-terminal. La **Figura 5** proporciona esquemas de tales diacuerpos que comprenden cinco cadenas polipeptídicas.

40 Se conocen en la técnica constructos alternativos para aplicaciones en las que es deseable una molécula tetravalente pero no se requiere un Fc, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos en tandem tetravalentes, también denominados "**TandAbs**" (ver, por ejemplo Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; Publicaciones de Patente Europea Nº EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 y EP 1293514; Publicaciones de PCT Nº WO 1999/057150, WO 2003/025018, y WO 2013/013700) que se forman por la homodimerización de dos cadenas idénticas, cada una de las cuales posee un dominio VH1, VL2, VH2 y VL2.

50 Recientemente, se han descrito estructuras trivalentes que incorporan dos dominios de unión de tipo diacuerpo y un dominio de tipo no diacuerpo y una región Fc (ver, por ejemplo, Solicitud de PCT Nº: PCT/US 15/33076, titulada "Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof", presentada el 29 de mayo de 2015, y PCT/US15/33081, titulada "Tri-Specific Binding Molecules That Specifically Bind to Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof", presentada el 29 de mayo de 2015). Tales moléculas trivalentes pueden utilizarse para generar moléculas monoespecíficas, biespecíficas o triespecíficas. Las **Figuras 6A-6F** proporcionan esquemas de tales moléculas trivalentes que comprenden 3 o 4 cadenas polipeptídicas.

#### 55 IV. Moléculas de unión a anti-PD-1 humana

60 Las moléculas de unión a PD-1 incluyen anticuerpos, diacuerpos, BiTE, etc. y son capaces de unirse a una porción (**epítopo**) continua o discontinua (por ejemplo, conformacional) de PD-1 humana (CD279). Las moléculas de unión a PD-1 también mostrarán preferiblemente la capacidad de unirse a moléculas de PD-1 de una o más especies no humanas, en particular, especies de primates (y especialmente una especie de primates, como el mono cynomolgus). Un polipéptido de PD-1 humana representativo (Secuencia NCBI NP\_005009.2; que incluye una secuencia señal de 20 residuos de aminoácidos (mostrada subrayada) y la proteína madura de 268 residuos de aminoácidos) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 68**):

**MQIPQAPWPV VWAQIQLGWR** PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA  
 TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL  
 5 PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE  
 VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI  
 GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT  
 10 IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

10 Las moléculas de unión a anti-PD-1 humana se caracterizan por cualquiera (uno o más) de los siguientes criterios:

- 15 (1) se unen específicamente a la PD-1 humana tal como se expresa de forma endógena en la superficie de una célula T humana estimulada;  
 (2) se unen específicamente a la PD-1 humana con una constante de unión en equilibrio ( $K_D$ ) de 40 nM o menos;  
 (3) se unen específicamente a PD-1 humana con una constante de unión en equilibrio ( $K_D$ ) de 5 nM o menos;  
 (4) se unen específicamente PD-1 humana con una constante de asociación ( $k_a$ ) de  $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  o más;  
 20 (5) se unen específicamente PD-1 humana con una constante de asociación ( $k_a$ ) de  $90,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$  o más;  
 (6) se unen específicamente PD-1 humana con una constante de disociación ( $k_d$ ) de  $7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  o menos;  
 (7) se unen específicamente PD-1 humana con una constante de disociación ( $k_d$ ) de  $2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  o menos;  
 (8) se unen específicamente a PD-1 de primates no humanos (por ejemplo, PD-1 de mono cynomolgus);  
 (9) inhiben (es decir, bloquean o interfieren con) la unión/actividad inhibidora) del ligando de PD-1 (PD-L1/PD-L2) a PD-1;  
 25 (10) estimulan una respuesta inmunitaria; y/o  
 (11) actúan en sinergia con un anticuerpo anti-LAG-3 humano para estimular una respuesta de células T específica de antígeno.

30 Como se usa aquí, el término "respuesta de células T específicas de antígeno" se refiere a respuestas de una célula T que resultan de la estimulación de la célula T con el antígeno para el cual la célula T es específica. Los ejemplos no limitativos de respuestas de una célula T tras la estimulación específica del antígeno incluyen la proliferación y producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ). La capacidad de una molécula para estimular una respuesta de células T específica de antígeno puede determinarse, por ejemplo, usando el ensayo de PBMC **estimulado** por el antígeno de enterotoxina tipo B de *Staphylococcus aureus* ("SEB") descrito en la presente.

35 Las moléculas de unión a anti-PD-1 humanas divulgadas, pero no reivindicadas en el presente documento, poseen los dominios VH y/o VL de los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humana murinos "PD-1 mAb 1", "PD-1 mAb 2", "PD-1 mAb 3", "PD-1 mAb 4", "PD-1 mAb 5", "PD-1 mAb 6", "PD-1 mAb 7", "PD-1 mAb 8", "PD-1 mAb 9", "PD-1 mAb 10", "PD-1 mAb 11", "PD-1 mAb 12", "PD-1 mAb 13", "PD-1 mAb 14", o "PD-1 mAb 15", y más 40 preferiblemente poseen 1, 2 o las 3 CDR<sub>H</sub>s del dominio VH y/o 1, 2 o las 3 CDR<sub>L</sub>s del dominio VL de tales anticuerpos monoclonales de anti-PD-1 humana. Tales moléculas de unión a anti-PD-1 humana preferidas incluyen anticuerpos biespecíficos (o multiespecíficos), anticuerpos quiméricos o humanizados, BiTe, diacuerpos, etc. y tales moléculas de unión tienen regiones Fc variantes.

45 La invención se refiere a moléculas de unión a PD-1, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, que comprenden un dominio de unión a PD-1 que posee:

- 50 (1) las tres CDR<sub>H</sub>s del dominio VH de PD-1mAb 7 y las tres CDR<sub>L</sub>s del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL2;  
 (2) el dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1;  
 (3) el dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL2; y  
 (4) los dominios VH y VL del hPD-1 mAb 7(1.2).

55 **A. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 1**

55 **1. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 1**

60 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 69**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

5 DVQLQESGPG RVKPSQSLSL TCTVTGFSIT **NDYAWN**WIRO FPGNKLEWMG  
**HITYSGSTS**Y **NPSLKS**RISI TRDTSKNHFF LQLSSVTPED TATYY**CARDY**  
**GSGYPYTL**DY WGQGTSVTVS S

10 CDR<sub>H</sub>1 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:71**): **NDYAWN**

15 CDR<sub>H</sub>2 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:72**): **HITYSGSTS****YNPSLKS**

20 CDR<sub>H</sub>3 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:73**): **DYGSGYPYTL**DY

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 1 es **SEQ ID NO: 70** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

30 cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac  
 35 cttctcagtc tctgtccctc acctgcactg tcactggctt ctcaatcacc  
**aatgattatg** **cctggaac**tg gatccgacag tttccaggaa acaaactgga  
 40 gtggatgggc **cacataac**ct **acagtggcag** **cactagctac** **aaccatctc**  
**tcaaa**agtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa ccacttcttc  
 45 ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc  
 aaga**gattac** **ggttagtggct** **accctatac** **tttggactac** tggggtaag  
 50 gtacctcagt caccgtctcc tcc

55 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 74**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

60 QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTC**SATSI**VS **YVY**WYQQKPG SSPQPWIY**LT**  
**SNL**ASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYC**QQW** **SDNPY**TFGGG  
 65 TKLEIK

70 CDR<sub>L</sub> 1 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 76**): **SATSI**SYVY  
 CDR<sub>L</sub> 2 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 77**): **LTSNL**AS  
 CDR<sub>L</sub> 3 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 78**): **QQW**SDNPY

75 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 1 es la **SEQ ID NO: 75** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

80 caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga  
 85 gaaggtcacc atgacctgca **gtgccac**ctc **aattgtaagt** **tacgtttact**  
 90 ggtaccagca gaagcctgga tcctcccccc aaccctggat ttat**ctcaca**  
**tccaac**ctgg **cttct**ggagt ccctgctcgc ttcaagtggca gtgggtctgg  
 95 gacctcttac tctctcacaa tcagcagcat ggaggctgaa gatgctgcca  
 100 cttattactg **ccagcagtgg** **agtataacc** **cgtacac**tt cggagggggg  
 accaagctgg aaataaaa

## 60 2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 1 para formar "hPD-1 mAb 1"

65 El anticuerpo anti-PD-1 humana murina PD-1 mAb 1 se humanizó y se desinmunizó adicionalmente cuando se identificaron epítopos antigenicos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras administración a un receptor humano. La humanización produjo un dominio VH humanizado, designado en la presente como "**hPD-1 mAb 1 VH1**", y un dominio VL humanizado designado en la presente como "**hPD-1 mAb 1 VL1**". Por consiguiente, a un anticuerpo que comprende los dominios VL

humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se hace referencia como "**hPD-1 mAb 1**".

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 1 VH1 (**SEQ ID NO: 79**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 DVQLQESGPG LVKPSQTL SL TCTVSGFSIS NDYAWNWIRQ PPGKGLEWIG  
HITYSGSTSY NPSLKSRLTI TRDTSKNQFV LTMTNMDPVD TATYYCARDY  
10 GSGYPYTLDY WGQGTTVTVS S

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 1 VH1 es la **SEQ ID NO: 80** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

15 gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtaagc catcccagac  
actgagcctg acttgcaccc tgagtggctt ctccatctca aatgactacg  
cctggaattg gattaggcag cctcccggt aagggtggta gtggatcgcc  
20 cacatcacat acagcggctc cacatcatat aatcccagtc tgaagagccg  
tcttaccatt actcgacaca ctagtaagaa ccagttgtt ctgaccatga  
ccaacatggta ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcaagattat  
25 ggttctggtt acccttata ac~~t~~cgactac tggggacagg gaaccactgt  
gaccgtgagc tcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 1 VL1 (**SEQ ID NO: 81**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

30 EIVLTQSPAT LSVSPGEKVT ITCSATSIVS YVYWYQQKPG QAPQPLIYLT  
SNLASGIPAR FSGSGSGTDF TLTISSEAE DAATYYCQOW SDNPYTFGGG  
35 TKVEIK

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 1 VL1 es la **SEQ ID NO: 82** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

40 gaaatcggtc tgacccagag cccagcaacc ctgtctgtct ccccccggaga  
aaaggtcacc attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact  
ggtatcagca gaagccccggta caggctcccc agcattgtat atatctgacc  
45 agcaacctgg cttctggat cccagctcg tttccggta gcgggtccgg  
gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa gacgcccggca  
cctattatttg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcggtggc  
50 accaaagtgc aaataaag

#### B. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 2

##### 1. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 2

55 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 2 (**SEQ ID NO: 83**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

60 DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSGSMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLS  
DYFDYWGQGT TLTVSS

65 CDR<sub>H</sub> 1 de PD-1 mAb 2 (**SEQ ID NO: 85**): SFGMH  
CDR<sub>H</sub> 2 de PD-1 mAb 2 (**SEQ ID NO: 86**): YISSGMSISYADTVKG

CDR<sub>H</sub> 3 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 87): LSDYFDY

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 2 es la SEQ ID NO: 84 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc  
 10 ccggaaactc tcctgtcag cctctggatt cgtttcagt agctttgaa  
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac  
atcagtagtg gcagtatgag cattcctat gcagacacag tgaagggccg  
 15 attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga  
 ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt  
gactacttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 88) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

20 DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLYHW YLQKPGQSPK  
 25 LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FFCSQTHV  
WTFGGGTKLE IK

30 CDR<sub>L</sub> 1 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 90): RSSQSLVHSTGNTYLYH  
 CDR<sub>L</sub> 2 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 91): RVSNRFS  
 CDR<sub>L</sub> 3 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 92): SQTTHVPWT

35 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 2 es la SEQ ID NO: 89 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

40 gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga  
 tcaaggctcc atctcttgca gatctagtc gagccttgtt cacagta  
cttacattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag  
 45 ctcctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggtcc ccgacaggtt  
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agtagagtg  
 aggctgagga tctggagtt ttttctgct ctcaaactac acatgttccg  
tggacgtccg gtggaggcac caagctggaa atcaa

## 2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 2 para formar "hPD-1 mAb 2"

50 El anticuerpo anti-PD-1 humana murino, PD-1 mAb 2, se humanizó y desinmunizó adicionalmente cuando se identificaron epítopos antigenicos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La humanización produjo un dominio VH humanizado, designado en la presente como "**hPD-1 mAb 2 VH1**", y un dominio VL humanizado designado en la presente como "**hPD-1 mAb 1 VL1**". Por consiguiente, cualquier anticuerpo que comprenda los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se denomina "**hPD-1 mAb 2**".

55 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 2 VH1 (SEQ ID NO: 93) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

60 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY  
ISSGSMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNLSRTED TALYYCASLS  
DYFDYWGQGT TTVVSS

65 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 2 VH1 es la SEQ ID NO: 94 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 gaagtgcata tgggtgagag tgggtggc ctgggcagc caggtggaaag  
 tctcggttg tcctgtcag caagcggatt tgtttcagc tctttggg  
tgcata tgggt gcgccaggct cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac  
atctccagcg ggtccatgtc tattagttat gccgacacag tgaaggcag  
 10 gtttactatc tcccggtgaca atgaaaaaaa cacactgtac ctgaaatga  
 atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttccctgtct  
gattactcg actact tgggg tcagggcaca actgtgacag tttttcc

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 2 VL1 (SEQ ID NO: 95 (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

20 DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSILV HSTGNTYLYHW YLQKPGQSPQ  
 LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTHVP  
WTFGQGTKLE IK

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 2 VL1 es la SEQ ID NO: 96 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

30 gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagttt ccctgggcca  
 gccagccagt atttcttgcggagttcaca gagtctggta cattccacag  
gaaatacata tctccat tgg tacctgcaaa aaccaggca gagccccca  
 ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt tctggcgtgc cagatcggtt  
 cagcggcagc gggctggca ctgatttac actgaaaatc tctagggtgg  
 35 agcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc  
tggactttt gccaaggta taagctggaa atcaag

#### C. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 3

40 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 97) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

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

50 CDR<sub>H</sub> 1 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 99): DYVMH  
 CDR<sub>H</sub> 2 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 100): TIDPETGGTAYNQFKKG  
 CDR<sub>H</sub> 3 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 101): EKITTIVEGYWYFDV

55 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 3 es la SEQ ID NO: 98 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

60

65

5 caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc  
 agtacgctg tcctgcaagg cttcggtcta cacatttact gactatgtaa  
tgcactgggt gaagcagaca cctgtgcatt gcctggaatg gattggaact  
attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa  
 10 ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac atggagctcc  
 gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag  
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac  
 agggaccacg gtcaccgtct cctca

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 3 (**SEQ ID NO: 102**)  
 (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

20 DVLLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGDTYLE YLQKPGQSPK  
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHLP  
YTFGGGTKLE IK

25 CDR<sub>L</sub> 1 de PD-1 mAb 3 (**SEQ ID NO: 104**): RSSQNIVHSNGDTYLE  
 CDR<sub>L</sub> 2 de PD-1 mAb 3 (**SEQ ID NO: 105**): KVSNRFS  
 CDR<sub>L</sub> 3 de PD-1 mAb 3 (**SEQ ID NO: 106**): FQGSHLPYT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 3 es la **SEQ ID NO: 103** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

30 gatgtttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga  
 tcaaggctcc atctttgca gatctagtca gaacattgtta catagtaatg  
gagacaccta tttggaattgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag  
 35 ctcctgatct ataaagtttc caaccgattt tctggggtcc cagacaggtt  
 cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc agcagagtg  
 aggctgagga tctgggagtt tattactgtttcaaggttc acatcttccg  
 40 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

#### D. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 4

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 107**)  
 (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

50 DVQLVESGGG LVQPGRGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSGSMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLT  
DYFDYWGQGT TLTVSS

55 CDR<sub>H</sub> 1 de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 109**): SFGMH  
 CDR<sub>H</sub> 2 de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 110**): YISSGSMSISYADTVKG  
 CDR<sub>H</sub> 3 de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 111**): LTDYFDY

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 4 es la **SEQ ID NO: 108** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

60

65

5 gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc  
 ccgaaactc tcctgtcag cctctggatt cgtttcagt agctttggaa  
tgcacgtgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat  
attagtagtg gcagtatgag tattcctat gcagacacag tgaaggccg  
 10 attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaatga  
 ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact  
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 112**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

15 DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSTGNTYFHW YLQKPGQSPK  
 LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQTTHVP  
 20 WTFGGGTKLE IK

25 CDR<sub>L</sub> 1 de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 114**): RSSQSLVHSTGNTYFH  
 CDR<sub>L</sub> 2 de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 115**): RVSNRFS  
 CDR<sub>L</sub> 3 de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 116**): SQTTHVPWT

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 4 es la **SEQ ID NO: 113** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

30 gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga  
 tcaaggctcc atctcctgca gatctagtca gagccttgtt cacagtactg  
gaaacaccta tttccatttgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag  
 35 ctcctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggtcc ccgacaggtt  
 cagtggcagt ggtcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
 aggctgagga tctggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg  
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaa

#### 40 E. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 5

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO: 117**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

45 QVQLQQPGVE LVRPGASVKL SCKASGYSFT AYWMNWMKQR PGQGLEWIGV  
IHPSDSETWL NQKFKD~~K~~ATL TVDKSSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH  
 50 YGSSPFAYWG QGTLVTVSA

55 CDR<sub>H</sub> 1 de PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO: 119**): AYWMN  
 CDR<sub>H</sub> 2 de PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO: 120**): VIHPSDSETWL~~N~~QKF~~K~~D  
 CDR<sub>H</sub> 3 de PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO: 121**): EHYGSSPFAY

60 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 5 es la **SEQ ID NO: 118** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5

10

15

caggtccaac tgccagcagcc tgggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc  
 agtgaagctg tcctgcaagg ctctggcta ctccttcacc gcctactgga  
tgaactggat gaaacagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg  
attcatcctt ccgatagtga aacttggta aatcagaagt tcaaggacaa  
 ggccacattg actgttagaca aatcctccag cacagcctac atgcaactca  
 tcagccccac atctgaggac tctgcggctt attactgtgc aagagagcac  
tacggtagta gcccgttgc ttactgggc caagggactc tggtaactgt  
 ctctgca

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO: 122**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 20 LIYAASNQGS GVPARFSGSG SGTDFLSNIH PMEEDDTAMY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKLEI K  
 25 CDR<sub>L</sub> 1 de PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO: 124**): RANESVDNYGMSFMN  
 CDR<sub>L</sub> 2 de PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO: 125**): AASNQGS  
 CDR<sub>L</sub> 3 de PD-1 mAb 5 (**SEQ ID NO: 126**): QQSKEVPT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 5 es la **SEQ ID NO: 123** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

30 gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
 gaggggccacc atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca  
tgagtttat gaactggttc caacagaaac cagcacagcc acccaaactc  
 35 ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag  
 tggcagtggg tctggacag atttcagcct caacatccat cctatggagg  
 agatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac  
 40 acgttcgag gggggaccaa gctggaaata aaa

#### F. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 6

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 6 (**SEQ ID NO: 127**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

EVKLVESGGG LVNPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PEKRL EWVAT  
 45 ISGGGSDTYY PDSVKGRFTI SRD NAKNNLY LQMSSLRSED TAL YYCAROK  
ATTWFAYWGQ GTL VTVST

50 CDR<sub>H</sub> 1 de PD-1 mAb 6 (**SEQ ID NO: 129**): SYGMS  
 CDR<sub>H</sub> 2 de PD-1 mAb 6 (**SEQ ID NO: 130**): TISGGGSDTYYPDSVKG  
 CDR<sub>H</sub> 3 de PD-1 mAb 6 (**SEQ ID NO: 131**): QKATTWFAY

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 6 es la **SEQ ID NO: 128** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

60

65

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

gaaatcgta tcacccagtc acctgcaacc ctctctctga gccccggta  
 acgtgccact ctcagctgca **gagcaagtga gagtgtggac aattacggca**  
**tgtccttcat gaac**tggttt cagcagaagc ctggcagcc acctaagctg  
 ctcatccacg **ccgcctctaa cgcggatct** ggggtgcctt cacgttttc  
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
 cagaggactt tgccgtctat ttctgc**cagc aatctaaaga ggtgccctat**  
**acttttgtg** gcgggaccaa ggttgagatc aaa

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 6 (**SEQ ID NO: 132**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT **ISCRASESVD NYGISFMN**WF QQKPGQPPKL  
**LIYPASNQGS** GVPARFSGSG SGTDFLSNIH PMEEDDAAMY FC**QQSKEVPW**  
**TFGGGT**KLEI K

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

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 6 es la **SEQ ID NO: 133** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
 gagggccacc atctcctgca **gagccagcga aagtgttgat aattatggca**  
**ttagtttat gaac**tggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc  
 ctcatctatc **ctgcataccaa ccaaggatcc** ggggtccctg ccaggtttag  
 tggcagtggg tctggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg  
 agatgtatgc tgcaatgtat ttctgt**cagc aaagtaagga gttccgtgg**  
**acgttccgtg** gaggcaccaa gctggaaatc aaa

#### G. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7

##### 1. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 7

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 137**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT **SYWMN**WVKQR PGQGLEWIGV  
**IHPSDSETWL DQKFKD**KATL TVDKSSTTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH  
**YGTSPFAY**WG QGTLVTVSS

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

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 7 es la **SEQ ID NO: 138** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

65

gagggtccaaac tgcagcagcc tggggctgaa ctgggtgaggc ctggagc  
agtgaagctg tcctgcaagg cttctggcta ctccttcacc agctactgga  
tgaactgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg  
attcatcattt ccgatagtga aacttggtta gatcagaagt tcaaggacaa  
ggccacattg actgttagaca aatcctccac cacagcctac atgcaactca  
tcagccccac atctgaggac tctgcggctt attactgtgc aagggagcac  
tacggtacta gcccgtttgc ttacttgggc caaggactc tggtcactgt  
qtcttcc

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 142**)  
(los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPARFSGSG FGTD~~FS~~LN~~I~~H PMEEDDAAMY FCQOSKEVPY  
~~T~~FGGGT~~K~~LEI K

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

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 7 es la SEQ ID NO: 143 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca  
gagggccacc atctcctgca **a gagccaacga aagtgttcat aattatggca**  
**tgagtttat gaac** tggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc  
ctcatccatg **ctgcatccaa ccaaggatcc** ggggtccctg ccaggtttag  
tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg  
aggatgatgc tgcaatgtat ttctgt **cagc aaagtaagga ggttccgtac**  
**acg** ttcggag qggggaccaa qctggaaata aaa

## 2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7 para formar "hPD-1 mAb 7"

El anticuerpo murino anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7 se humanizó y se desinmunitizó adicionalmente cuando se identificaron epítopos antigenéticos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La humanización produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como "hPD-1 mAb 7 VH1" y "hPD-1 mAb 7 VH2", y tres dominios VL humanizados designados en la presente como "hPD-1 mAb 7 VL1", "hPD-1 mAb 7 VL2", y "hPD-1 mAb 7 VL3". Cualquiera de los dominios VL humanizados puede emparejarse con cualquiera de los dominios VH humanizados. En consecuencia, a cualquier anticuerpo que comprenda uno de los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se hace referencia genéricamente como "hPD-1 mAb 7", y a las combinaciones particulares de dominios VH/VL humanizados se hace referencia por referencia como dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hPD-1 mAb 7 VH1 y hPD-1 mAb 1 VL2 se hace referencia específicamente como "hPD-1 mAb 7 (1.2)".

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1 (**SEQ ID NO: 147**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT **SYWMN**WVRQA PGQGLEWIG**V**  
**IHP****PSD****SET****WL** **DQKFKD**RTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR**EH**  
YGTSPFAYWG QGTLTVSS

65 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VH1 es la SEQ ID NO: 148 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 caagttcaat tggcacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag  
 tgttaagggtg tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga  
tgaattggtt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg gattggggtg  
 10 atacatcctt ctgacagcga aacatggttg gaccagaaat ttaaagatcg  
 tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atgaaactct  
 ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac  
 15 tacggcacat cacctttgc atactggggc cagggactc tcgtaaccgt  
 atcctcc

16 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH2 (SEQ ID NO: 149) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

20 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWAGV  
IHPPSDSETWL DQKFKDRTTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VH2 es la SEQ ID NO: 150 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

30 caagttcaat tggcacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag  
 tgttaagggtg tcctgcaaag ccagcggtta cagctttaca agctattgga  
tgaattggtt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg  
 35 atacatcctt ctgacagcga aacatggttg gaccagaaat ttaaagatcg  
 tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atgaaactct  
 ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac  
 40 tacggcacat cacctttgc atactggggc cagggactc tcgtaaccgt  
 atcctcc

41 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL1 (SEQ ID NO: 151) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

45 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNOGS GPSPRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

50 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VL1 es la SEQ ID NO: 152 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

55 gaaatcgta tcacccagtc acctgcaacc cttctctga gccccgggtga  
 acgtgccact ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca  
tgtcttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg  
 60 ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgttttc  
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgcccstat  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

65 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL2 (SEQ ID NO: 153) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

10 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VL2 es la **SEQ ID NO: 154** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

15 gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggta  
 acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca  
tgtcttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg  
 20 ctcatccacg ccgccctctaa ccagggatot ggggtgcctt cacgttttc  
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
 25 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

30 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL3 (**SEQ ID NO: 155**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

35 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHASNRGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQOSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

40 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VL3 es la **SEQ ID NO: 156** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

45 gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggta  
 acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca  
tgtcttcat gaactggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg  
 50 ctcatccacg ccgccctctaa ccgcggatot ggggtgcctt cacgttttc  
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc  
 55 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat  
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

60 La CDR<sub>L</sub> 1 del dominio VL de ambos hPD-1 mAb 7 VL2 y hPD-1 mAb 7 VL3 comprende una sustitución de aminoácidos de asparagina a serina y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: RASEVDNYGMSFMN (**SEQ ID NO: 157**), la serina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios PD-1 mAb 7 CDR<sub>L</sub> 1 descritos anteriormente.

65 Además, la CDR<sub>L</sub>2 del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL3 comprende una sustitución de aminoácidos de glutamina a arginina y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: AASN RGS (**SEQ ID NO: 158**), la arginina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios PD-1 mAb 7 CDR<sub>L</sub>2 descritos anteriormente.

#### 55 H. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 8

60 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 8 (**SEQ ID NO: 159**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

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

65 CDR<sub>H</sub>1 de PD-1 mAb 8 (**SEQ ID NO: 161**): DYYMN

CDR<sub>H</sub>2 de PD-1 mAb 8 (**SEQ ID NO: 162**): DINPKNGDTHYNQKFKG  
 CDR<sub>H</sub>3 de PD-1 mAb 8 (**SEQ ID NO: 163**): DFDY

5 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 8 es la **SEQ ID NO: 160** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

10 gagggccagc tgcaacaatc tggaccttag ctggtaagg ctggggcttc  
 agtgaagata tcctgttaagg ctctggata cacgttcact gactactaca  
tgaactgggt gaagcagaac catggaaaga gccttgagt gattgggat  
attaatccta aaaatggtga cactcactac aaccagaagt tcaagggcga  
 15 ggccacattg actgttagaca agtcctccac cacagcctac atggagctcc  
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgattt  
gactacttgg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcc

20 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 8 (**SEQ ID NO: 164**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

25 DVVMTQTPLS LPVGLGDQAS ISCRSSQTLV YSNGNTYLNW FLQKPGQSPK  
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GS GTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
FTFGSGTKLE IK

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

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 8 es la **SEQ ID NO: 165** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

35 gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttgaga  
 tcaaggctcc atctttgatctagtca gacccttgta tatagtaatg  
gaaacaccta tttaaatttgg ttccctgcaga agccaggcca gtctccaaag  
 40 ctcctgatct acaaagttc caaccgattt tctgggtcc cagacaggtt  
 cagtggcagt gcatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
 aggctgagga tctgggagtt tatttctgctcaaaagtac acatgttcca  
 45 ttcacgttcg gctcgggac aaagttggaa ataaaa

#### I. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 9

##### 1. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 9

50 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 169**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

55 EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQT PEKLEWVAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQISSLRSED TALYYCARYG  
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

60 CDR<sub>H</sub>1 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 171**): SYLVS  
 CDR<sub>H</sub>2 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 172**): TISGGGGNTYYDSVKG  
 CDR<sub>H</sub>3 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 173**): YGFDGAWFAY

65 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 9 es la **SEQ ID NO: 170** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 gaagtgatgc tggggagtc tggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaactc tcctgtcag cctctggatt cacttcagt agttatcttg  
tgtcttggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc  
 10 attagtggtg gtggtggtaa cacctactat tcagacagtg tgaagggtcg  
 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatca  
 gcagtctgag gtctgaggac acggcattgt attactgtgc aaggtatggt  
 15 ttcgacggcg cctgggttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt  
 ctcttcc

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 174**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

20 DIQMTQSPAS LSASVGDIVT ITCRASENIY SYLAWYQQKQ EKSPQLLVYN  
AKTTLAAGVPS RFSGSGSGTQ FSLTINSLQP EDFGNYYCQH HYAVPWT<sup>FGG</sup>  
 GTRLEIT

25 CDR<sub>L1</sub> de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 176**): RASENIYSYLA  
 CDR<sub>L2</sub> de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 177**): NAKTLAA  
 CDR<sub>L3</sub> de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 178**): QHHYAVPWT

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 9 es la **SEQ ID NO: 175** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

35 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtggaga  
 tattgtcacc atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag  
catggtatca gcagaaacag gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataat  
gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca agttcagtg gcagtggatc  
 40 aggacacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct gaagattttg  
 ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcggtgga  
 ggcaccagac tggaaatcac a

45 **2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 9 para formar "hPD-1 mAb 9"**

50 El anticuerpo murino anti-PD-1 humana PD-1 mAb 9 anteriormente descrito se humanizó y se desinmunizó adicionalmente cuando se identificaron epítopos antigenicos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La humanización produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como "**hPD-1 mAb 9 VH1**" y "**hPD-1 mAb 9 VH2**", y dos dominios VL humanizados designados en la presente como "**hPD-1 mAb 9 VL1**" y "**hPD-1 mAb 9 VL2**". Cualquiera de los dominios VL humanizados puede emparejarse con los dominios VH humanizados. Por consiguiente, a cualquier anticuerpo que comprenda uno de los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se hace referencia genéricamente como "**hPD-1 mAb 9**" y a combinaciones particulares de dominios VH/VL humanizados se hace referencia como dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hPD-1 mAb 9 VH1 y hPD-1 mAb 9 VL2 se hace referencia es específicamente como "**hPD-1 mAb 9 (1.2)**".

60 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH1 (**SEQ ID NO: 179**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

65 EVQLVESGGG LVRPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQA PGKGLEWVAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMSLRAED TATYYCARYG  
FDGAWFAY<sup>WG</sup> QGTLVTVSS

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 9 VH1 es la **SEQ ID NO: 180** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5           gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggtgac ccgggggaag  
tctgaaaactg tcctgtcag catcaggatt tacttttca tcttatctcg  
tgtcttgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggatg ggtggccact  
10           atctccggtg gaggtggcaa caccatac agcgacagtg tcaagggaag  
atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga  
actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgcatgga  
15           tttgcggcg catggttgc ctactggga cagggcacat tggttaaccgt  
tagctcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH2 (**SEQ ID NO: 181**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

20           EVQLVESGGG LARP~~GG~~SLKL SCAASGFTFS SYLVGWVRQA PGKGLEWTAT  
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDN~~AK~~NSLY LQMNSARAED TATYYCARYYG  
25           FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 9 VH2 es la **SEQ ID NO: 182** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

30           gaggtgcagc tggtggaaag tgggggcggc ctggcgac ccgggggaag  
tctgaaaactg tcctgtcag catcaggatt tacttttca tcttatctcg  
tggcttgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggatg gacggccact  
35           atctccggtg gaggtggcaa caccatac agcgacagtg tcaagggaag  
atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga  
actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgcatgga  
40           tttgcggcg catggttgc ctactggga cagggcacat tggttaaccgt  
tagctcc

45           La CDR<sub>H1</sub> del dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH2 comprende una sustitución de aminoácidos de serina a glicina y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: SYLVG (**SEQ ID NO: 183**), la glicina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios de CDR<sub>H1</sub> de PD-1 mAb 9 descritos anteriormente.

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL1 (**SEQ ID NO: 184**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

50           DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SYLAWYQQKP GKAPKLLIYN  
AKTIAAGVPS RFSGSGSGTD FTLT~~TI~~SSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ  
55           GT~~K~~LEIK

60           Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 9 VL1 es la **SEQ ID NO: 185** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga  
 tcgggtcacc atcacctgcc **gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg**  
 10 **cct**tggtatca acagaaaacct ggttaagccc caaaattgct catttac**aac**  
**gccaagaccc tcgcagct**gg cgtgccaagt aggttctcag gcagcggctc  
 agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc gaggatttg  
 ccacttacta ctgc**cagcat cattacgcag tgccctggac** cttcggacaa  
 ggcactaagc tcgagatcaa a

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2 (**SEQ ID NO: 186**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

15 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT **ITCRASENIY NYLA**WYQQKP GKAPKLLIYD  
**AKTIAA**GVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYC**QH HYAVPWT**FGQ  
 20 GTKLEIK

20 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 9 VL2 es la **SEQ ID NO: 187** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

25 gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga  
 tcgggtcacc atcacctgcc **gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg**  
**cct**tggtatca acagaaaacct ggttaagccc caaaattgct catttac**gac**  
 30 **gccaagaccc tcgcagct**gg cgtgccaagt aggttctcag gcagcggctc  
 agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc gaggatttg  
 ccacttacta ctgc**cagcat cattacgcag tgccctggac** cttcggacaa  
 ggcactaagc tcgagatcaa a

35 La CDR<sub>L1</sub> del dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2 comprende una sustitución de aminoácidos de serina a asparagina y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: RASENIYNYLA (**SEQ ID NO: 188**), la asparagina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios de CDR<sub>L</sub> de 1PD-1 mAb 9 descritos anteriormente.

40 La CDR<sub>L2</sub> del dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2 comprende una sustitución de aminoácidos de asparagina a aspartato y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: **DAKTLAA** (**SEQ ID NO: 189**), el aspartato sustituido se muestra subrayado). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios de CDR<sub>L2</sub> de PD-1 mAb 7 descritos anteriormente.

#### 45 J. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 10

50 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 190**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

50 EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **NYLMS**WVRQT PEKLEWVAS  
**ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI** SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCAR**QE**  
 55 **LAFDYWGQGT** TLTVSS

CDR <sub>H1</sub> de PD-1 mAb 10 ( <b>SEQ ID NO: 192</b> ):	NYLMS
CDR <sub>H2</sub> de PD-1 mAb 10 ( <b>SEQ ID NO: 193</b> ):	SISGGGSNIYYPDSVKG
CDR <sub>H3</sub> de PD-1 mAb 10 ( <b>SEQ ID NO: 194</b> ):	QELAFDY

60 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 10 es la **SEQ ID NO: 191** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 gaagtgatac tggggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaaactc tcctgtcag cctctggatt cacttcagt aactatctca  
tgtcttggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt  
attagtggtg gtggtagtaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg  
 10 attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaatga  
 acagtctgag gtctgaggac acggcattgt attactgtgc aagacaagaa  
ctggcttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 195**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

15 DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRTSDDIS NFLNWYQQKP DGTIKLLIYY  
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GSTLPWTFGG  
 20 GTKLEII

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

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 10 es la **SEQ ID NO: 196** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

25 gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctggaga  
 30 cagagtcacc atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aatttttaa  
actggtatca gcagaaacca gatggaacta ttaaactcct gatctactac  
acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc  
 35 tggAACAGAT tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg  
 ccacttactt ttgccaacag ggtagtagc ttccgtggac gttcgggtgga  
 ggcaccaagc tggaaatcat a

#### 40 K. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 11

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 200**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

45 EVQLQQSGTV LARPGASVKM SCKTSGYTFT GYWMHWVKQR PGQGLKWMGA  
IYPGNSDTHY NQKFKGKAKL TAVTSASTAY MELSSLTNED SAIYYCTTGT  
YSYFDVWTG TTVTVSS

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

55 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 11 es la **SEQ ID NO: 201** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

gagggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc  
agtgaagatg tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc **ggctactgga**  
5 **tgca**cactgggt aaaacagagg cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct  
**atttatcctg** **gaaatagtga** **tactca****tac** aaccagaagt **tcaagg**gcaa  
ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac atggagctca  
10 gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tactgggacc  
**tactcg****tact** **tcgatgtc**tg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc a

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 205**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

15 DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQHRT NGSPLLLIKY  
ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SNSWLTFGAG  
20 TKLELK

CDR<sub>L1</sub> de PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO: 207): RASQSIGTSIH  
CDR<sub>L2</sub> de PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO: 208): YASESIS  
CDR<sub>L3</sub> de PD-1 mAb 11 (SEQ ID NO: 209): QQSNSTWLT

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 11 es la **SEQ ID NO: 206** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

30 gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga  
aagagtca ttctcctgca ggccagtc gagcattggc acaagcatac  
actggtatca gcacagaaca aatggttctc caaggcttct cataaaagtat  
gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc aggttagtg gcagtggatc  
35 agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtc gaagatattg  
cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cggtgctggg  
accaaqctqq aqctqaaa

40 L. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 12

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 12 (**SEQ ID NO: 210**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

45 QGHLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGFTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGT  
50 IDPE TGGTAY NQKFKGKAIL TVDKSSTTY MELRSLTSED SAVFYCSRER  
ITTVVEGAYW YFDVWGTGTT VTVSS

55 CDR<sub>H1</sub> de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 212): DYEMH  
CDR<sub>H2</sub> de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 213): TIDPETGGTAYNQKFKG  
CDR<sub>H3</sub> de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 214): ERITTVVEGAYWYFDV

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 12 es la **SEQ ID NO: 211** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

cagggtcacc tgccagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc  
 agtacgcgtg tcctgcaagg cttgggctt cacatttact **gactatgaga**  
**tgca**ctgggt gaaacagaca cctgtgcatt gcctggaatg gattggg**act**  
**attgatcctg** aaactggtgg **tactgcctac** aatcagaagt **tcaagggca**a  
 ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac atggagctcc  
 gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aaga**gagagg**  
**attactacgg** **ttgttgaggg** **ggcatactgg** **tacttcgatg** **tctggggcac**  
 aggaccacg gtcaccgtct cctca

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 215**)

(los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS **ISCRSSQNIV HSNGNTYLEW** YLQKPGQSPK  
**LLICKVSTRF** SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYC**FQGSHVP**  
**YT**FGGGTKLE IK

CDR<sub>L</sub>1 de PD-1 mAb 12 (**SEQ ID NO: 217**): RSSQNIVHSNGNTYLE

CDR<sub>L</sub>2 de PD-1 mAb 12 (**SEQ ID NO: 218**): KVSTRFS

CDR<sub>L</sub>3 de PD-1 mAb 12 (**SEQ ID NO: 219**): FQGSHVPYT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 12 es la **SEQ ID NO: 216** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

gatgtttga tgacccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga  
 tcaaggctcc atctttgca **gatctagtca** **gaacattgtta** **catagtaatg**  
**gaaacaccta** **tttagaa**ttgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag  
 ctcctgatct **gcaaagttc** **cacccgattt** **tctggggtcc** cagacaggtt  
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg  
 aggctgagga tctgggagtt tattattgtc **ttcaagttc** **acatgttccg**  
**tacacg**ttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

#### M. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 13

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO:**

**220**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS **SHTMS**WVRQT PEKLEWVAT  
**ISGGGSNIYY** **PDSVKGRFTI** SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCAR**QA**  
**YYGNYWYFDV** WGTGTTVTVS S

CDR<sub>H</sub>1 de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO: 222**): SHTMS

CDR<sub>H</sub>2 de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO: 223**): TISGGGSNIYYPDSVKG

CDR<sub>H</sub>3 de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO: 224**): QAYYGNYWYFDV

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 13 es la **SEQ ID NO: 221** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 gaagtatgc tggggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaaactc tcctgtcag cctctggatt cacttcagt agccatacca  
tgtcttggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc  
attagtggtg gtggttctaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg  
 10 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaa atg  
 gcagtctgag gtctgaggac acggccttgc attactgtgc aagacaagct  
tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacgg  
 caccgtctcc tcc

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO: 225**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

20 DIQMTQSPAT QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKSPQLLIYA  
ATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSFKISSLQA EDFVSYYCQQ LDSIPWTFGG  
 GTKLEIK

25 CDR<sub>L</sub>1 de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO: 227**): LASQTIGTWLA  
 CDR<sub>L</sub>2 de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO: 228**): AATSLAD  
 CDR<sub>L</sub>3 de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO: 229**): QQQLDSIPWT

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 13 es la **SEQ ID NO: 226** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

35 gacattcaga tgacccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctggaga  
 aagtgtcacc atcacgtgcc tggcaagtca gaccattgg acatggtag  
catggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct  
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca agttcagtg gtagtggatc  
 tggcacaaaa tttttttca agatcagcag cttacaggct gaagatttg  
 taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcggtgaa  
 40 ggcaccaagc tggaaatcaa a

#### N. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 14

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 14 (**SEQ ID NO: 230**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

50 QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYNFI SYWITWVKQR PGQGLQWIGN  
IYPGTDGTTY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MHLSRLTSED SAVYYCATGL  
HWYFDVWTG TTWTVSS

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

60 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 14 es la **SEQ ID NO: 231** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc  
 agtgaagatg tcctgcaagg cttctggcta caacttcattc agctactgga  
taacctgggt gaaacagagg cctgacaag gccttcagt gattggaaaat  
atttatcctg gtactgatgg tactacctac aatgagaagt tcaagagcaa  
 10 ggcacactg actgttagaca catcctccag cacagcctac atgcacactca  
 gtcgcctgac atctgaggac tctgcggctt attactgtgc aactgggcta  
cactggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggta ccgtctcctc c

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 14 (**SEQ ID NO: 235**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

15 DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQSVG TNVAWYQQKP GQSPKALIYS  
ASSRFSGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNSYPYTFGG  
 20 GTKLEIK  
 CDR<sub>L</sub>1 de PD-1 mAb 14 (**SEQ ID NO: 237**): KASQSVGTNVA  
 CDR<sub>L</sub>2 de PD-1 mAb 14 (**SEQ ID NO: 238**): SASSRFS  
 CDR<sub>L</sub>3 de PD-1 mAb 14 (**SEQ ID NO: 239**): QQYNSYPYT

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 14 es la **SEQ ID NO: 236** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

30 gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga  
 cagggtcagt gtcacctgca aggccagtca gagtggtgggt actaatgttag  
cctgttatca acagaagccc ggtcaatctc ctaaaggact gattacttgc  
gcacatcctccc gattcagtgg cgtccctgat cgcttcacag gcagtggatc  
 35 tggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct gaagacttgg  
 cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg  
 gggaccaagc tggaaataaa a

40 0. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 15

1. Anticuerpo murino anti-PD-1 humana PD-1 mAb 15

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 240**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

50 EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFIFS SYLISWVRQT PEKLEWVAA  
ISGGGADTYY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCTRRG  
TYAMDYWGQG TSVTVSS  
 CDR<sub>H</sub>1 de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 242**): SYLIS  
 CDR<sub>H</sub>2 de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 243**): AISGGGADTYYADSVKG  
 CDR<sub>H</sub>3 de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 244**): RGTYAMDY

55 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 15 es la **SEQ ID NO: 241** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 gaagtgatgc tggggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc  
 cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt catttcagt agctatctca  
tctcttgggt tcgcccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgctgcc  
attagtggtg gtggtgctga cacctactat gccgacagtg tgaagggt<sup>cg</sup>  
 10 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat ctgcaaatga  
 gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg  
acctatgcta tggactact gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc c

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 245**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

15 DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITCLASOTIG TWLAWYQQKP GKSPQLLIYA  
ATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSFKISSLQA EDFVNYYCQQ LYSIPWTFGG  
 20 GTKLEIK  
 CDR<sub>L</sub>1 de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 247**): LASQTIGTWLA  
 CDR<sub>L</sub>2 de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 248**): AATSLAD  
 CDR<sub>L</sub>3 de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 249**): QQLYSIPWT

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 15 es la **SEQ ID NO: 246** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

30 gacattcaga tgacccagtc tccgcctcc cagtcgtcat ctctgggaga  
 aagtgtcacc atcacatgcc tggcaagtca gaccattgg acatggtt  
ag catggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct  
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtatgtggatc  
 35 tggcacaaaa ttttcttca agatcagcag cttacaggct gaagatttg  
 taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcggtgga  
 ggcaccaagc tggaaatcaa a

40 **2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 15 para formar "hPD-1 mAb 15"**

45 El anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 15 descrito anteriormente se humanizó y se desinmunió adicionalmente cuando se identificaron epítopos antigenicos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La humanización produjo un dominio VH humanizado, designado en la presente como "**hPD-1 mAb 2 VH1**", y un dominio VL humanizado designado en la presente como "**hPD-1mAb 1 VL1**". A un anticuerpo que comprende el dominio VL humanizado emparejado con el dominio VH humanizado se hace referencia como "**hPD-1 mAb 15**".

50 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 15 VH1 (**SEQ ID NO: 250**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA  
ISGGGADTYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG  
 55 TYAMDYWGQG TLTVVSS

60 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 15 VH1 es la **SEQ ID NO: 251** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

5 gaagtgcac tggttgaaag tggccggcggg ctggcgcggc caggtggttc  
 actcagactg tcttgcgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta  
tctcttgggt ggcggcaagcc ccaggtaagg gccttgaatg ggtcggccgc  
attagtgggg gtggcgcga tacatattat gcccacagcg tcaagggacg  
 10 tttcaccatc agcaggaca acgccaagaa tagccttac ctgcagatga  
 actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgccgg  
acttacgcta tggactattg gggccaggc accttggtca ctgtctcatc c

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 15 VL1 (**SEQ ID NO: 252**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

20 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASOTIG TWLAWYQQKP GKAPKLLIYA  
ATSLADGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDFATYYCQQ LYSIPWTFGQ  
 GTKLEIK

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 15 VL1 es la **SEQ ID NO: 253** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

25 gatatccaga tgacccagtc tccagctct ctcagtgcac gcgtaggcga  
 ccgtgtgacc atcacctgtc tggccagtc gaccattgga acctggctcg  
cctggtatca gcagaaacct ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgccc  
 30 gccacctccc tgcagatgg agtgcctcc cgatttagcg ggtccgggtc  
 cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc gaggatttcg  
 ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttggtcag  
 35 ggtactaaac tggagatcaa a

#### V. Anticuerpos anti-PD-1 humana PD-1 mAb 1-15, y sus derivados que tienen una región Fc modificada

40 En la función inmune tradicional, la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con las células del sistema inmunitario da como resultado una amplia variedad de respuestas, que varían desde funciones efectoras como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis hasta señales inmunomoduladoras como la regulación de la proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician mediante la unión de la región Fc de anticuerpos o complejos inmunes a receptores de superficie celular especializados en células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunitarios resulta de la heterogeneidad estructural de los tres receptores Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIII (CD16) son receptores de activación (es decir, mejora del sistema inmunitario); FcγRIIB (CD32B) es un receptor inhibidor (es decir, amortiguador del sistema inmunitario). Además, la interacción con el receptor de Fc neonatal (FcRn) media el reciclaje de moléculas de IgG desde el endosoma a la superficie celular y su liberación a la sangre. La secuencia de aminoácidos de IgG1 de tipo salvaje ejemplar (**SEQ ID NO: 1**), IgG2 (**SEQ ID NO: 2**), IgG3 (**SEQ ID NO: 3**) e IgG4 (**SEQ ID NO: 4**) se han presentado anteriormente.

55 La modificación de la región Fc lleva normalmente a un fenotipo alterado, por ejemplo, vida media en suero alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a las enzimas celulares o función efectora alterada. Puede ser deseable modificar un anticuerpo u otra molécula de unión de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, con respecto a la función efectora, por ejemplo, para mejorar la eficacia de dicha molécula en el tratamiento del cáncer. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en ciertos casos, por ejemplo en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica el bloqueo o antagonismo, pero no la muerte de las células que portan un antígeno objetivo. La función efectora aumentada es generalmente deseable cuando se dirige a células indeseables, como células tumorales y extrañas, donde los FcγR se expresan a niveles bajos, por ejemplo, células B específicas de tumores con niveles bajos de FcγRIIB (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, CLL y linfoma de Burkitt). En dichas realizaciones, las moléculas de la divulgación, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, con actividad de función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde se desea una eficacia mejorada de la actividad de la función efectora.

En ciertas realizaciones, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc que posee una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones, delecciones o inserciones) en la secuencia de aminoácidos de una región Fc de tipo salvaje (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), que reducen la afinidad y la avidez de la Región Fc y, por tanto, la molécula de la divulgación, por uno o más receptores FcγR. En otras realizaciones, las moléculas de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc que posee una o más modificaciones de los aminoácidos de la región Fc de tipo salvaje, que aumentan la afinidad y la avidez de la región Fc y, por tanto, la molécula de la invención, para uno o más receptores FcγR. En otras realizaciones, las moléculas comprenden una región Fc variante en donde dicha variante confiere o media una actividad aumentada de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o una unión aumentada a FcγRIIA, con respecto a una molécula que no comprende región Fc o que comprende una región Fc de tipo salvaje. En realizaciones alternativas, las moléculas comprenden una región Fc variante en donde dicha variante confiere o media una actividad de ADCC disminuida (u otra función efectora) y/o una unión aumentada a FcγRIIB, con respecto a una molécula que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, abarca moléculas de unión a PD-1 que comprenden una región Fc variante, tal región Fc variante no muestra una unión detectable a ningún FcγR, con respecto a una molécula comparable que comprende la Región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones, la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, abarca moléculas de unión a PD-1 que comprenden una región Fc variante, cuya región Fc variante solo se une a un único FcγR, preferiblemente uno de FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIIA. Cualquiera de tal afinidad y/o avidez aumentada se evalúa preferiblemente midiendo *in vitro* el grado de unión detectable a FcγR o la actividad relacionada con FcγR en células que expresan niveles bajos de FcγR cuando la actividad de unión de la molécula original (sin la región Fc modificada) no puede detectarse en las células, o en células que expresan antígenos objetivo del receptor no FcγR a una densidad de 30.000 a 20.000 moléculas/célula, a una densidad de 20.000 a 10.000 moléculas/célula, a una densidad de 10.000 a 5.000 moléculas/célula, a una densidad de 5.000 a 1.000 moléculas/célula, a una densidad de 1000 a 200 moléculas/célula o a una densidad de 200 moléculas/célula o menos (pero por lo menos 10, 50, 100 o 150 moléculas/célula).

Las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden comprender una región Fc variante que tiene afinidades alteradas por un receptor Fcγ activador y/o inhibidor. En una realización, la molécula de unión a PD-1 comprende una región Fc variante que tiene afinidad aumentada para FcγRIIB y afinidad disminuida para FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. En otra realización, la molécula de unión a PD-1 de la presente divulgación comprende una región Fc variante, que tiene afinidad disminuida por FcγRIIB y afinidad aumentada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. En otra realización más, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc variante que tiene afinidad disminuida por FcγRIIB y afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. En otra realización más, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc variante, que tiene una afinidad sin cambios para FcγRIIB y una afinidad disminuida (o aumentada) para FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc variante que tiene una afinidad alterada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA de tal manera que la inmunoglobulina tiene una función efectora mejorada. Los ejemplos no limitativos de funciones de células efectoras incluyen citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión de C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento.

En una realización preferida, la alteración en la afinidad o función efectora es por lo menos 2 veces, preferiblemente por lo menos 4 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 6 veces, por lo menos 7 veces, por lo menos 8 veces, por lo menos 9 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 50 veces, o por lo menos 100 veces, con respecto a la de una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones de la invención, la región Fc variante se une inmunoespecíficamente a uno o más FcR con por lo menos un 65%, preferiblemente por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225% o 250% más de afinidad con respecto a una molécula que comprende una Región Fc de tipo salvaje. Tales mediciones pueden ser ensayos *in vivo* o *in vitro* y, en una realización preferida, son ensayos *in vitro* como ELISA o ensayos de resonancia de plasmones de superficie.

En diferentes realizaciones, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc variante en donde dicha variante agoniza por lo menos una actividad de un receptor FcγR, o antagoniza por lo menos una actividad de un receptor FcγR. En una realización preferida, las moléculas comprenden una variante que antagoniza con una o más

actividades de Fc $\gamma$ RIIB, por ejemplo, señalización mediada por receptor de células B, activación de células B, proliferación de células B, producción de anticuerpos, influjo de calcio intracelular de células B, progresión del ciclo celular, inhibición de la señalización de Fc $\epsilon$ RI mediada por Fc $\gamma$ RIIB, fosforilación de Fc $\gamma$ RIIB, reclutamiento de SHIP, fosforilación de SHIP y asociación con Shc, o actividad de una o más moléculas en sentido descendente (por ejemplo, MAP quinasa, JNK, p38 o Akt) en la vía de transducción de señales de Fc $\gamma$ RIIB. En otra realización, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una variante que agoniza con una o más actividades de Fc $\epsilon$ RI, por ejemplo, activación de mastocitos, movilización de calcio, desgranulación, producción de citoquinas o liberación de serotonina.

En ciertas realizaciones, las moléculas comprenden una región Fc que comprende regiones de dos o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Como se usa en la presente, se dice que una región Fc es de un isótipo de IgG particular si su secuencia de aminoácidos es más homóloga a ese isótipo con respecto a otros isotipos de IgG. Los varios isotipos de IgG muestran diferentes propiedades físicas y funcionales, incluyendo la vida media en suero, la fijación del complemento, las afinidades de unión de Fc $\gamma$ R y las actividades de la función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, etc.) debido a diferencias en las secuencias de aminoácidos de su región bisagra y/o Fc, por ejemplo, como se describe en Flesch y Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel et al. (1993) J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040; o Brüggemann et al. (1987) J. Exp. Med 166:1351-1361. Este tipo de región Fc variante puede usarse sola, o en combinación con una modificación de aminoácidos, para afectar a la función efectora mediada por Fc y/o la actividad de unión. En combinación, la modificación de aminoácidos y la región Fc/bisagra de IgG pueden mostrar una funcionalidad similar (por ejemplo, afinidad aumentada por Fc $\gamma$ RIIA) y puede actuar aditivamente o, más preferiblemente, sinérgicamente para modificar la funcionalidad efectora en la molécula de la divulgación, con respecto a una molécula de la divulgación que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otras realizaciones, la modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG pueden mostrar una funcionalidad opuesta (por ejemplo, afinidad aumentada y disminuida por Fc $\gamma$ RIIA, respectivamente) y pueden actuar para templar o reducir selectivamente una funcionalidad específica en la molécula de la divulgación, con respecto a una molécula de la divulgación que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo salvaje del mismo isótipo.

En una realización específica preferida, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicha molécula tiene una afinidad alterada por un FcR, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en las posiciones que hacen un contacto directo con Fc $\gamma$ R basado en análisis cristalográfico y estructural de interacciones Fc-FcR como las divulgadas por Sondermann et al. (2000) Nature 406: 267-73. Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que hacen contacto directo con Fc $\gamma$ R son los residuos de aminoácidos 234-239, los residuos de aminoácidos 265-269 (giro B/C), los residuos de aminoácidos 297-299 (giro C/E) y residuos de aminoácidos 327-332 (giro F/G). En algunas realizaciones, las moléculas de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden variantes de regiones Fc que comprenden la modificación de por lo menos un residuo que no hace contacto directo con un Fc $\gamma$ R en base a análisis estructural y cristalográfico, por ejemplo, no está dentro del sitio de unión Fc-Fc $\gamma$ R.

Las regiones Fc variantes son bien conocidas en la técnica, y en la presente invención puede usarse cualquier región Fc variante conocida para conferir o modificar la función efectora mostrada por una molécula de la invención que comprende una región Fc (o porción de la misma) como se ensaya funcionalmente, por ejemplo, en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos. Por ejemplo, las variantes de la región Fc identificadas como alteración de la función efectora se divulan en las Publicaciones de PCT Nº WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; y WO 2008/140603, y puede usarse cualquier variante adecuada divulgada en la mismas en las presentes moléculas.

En ciertos casos, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos en una o más regiones, tales modificaciones alteran (con respecto a una región Fc de tipo salvaje) la **Proporción de afinidades** de la región Fc variante con un Fc $\gamma$ R activador (como Fc $\gamma$ RIIA o Fc $\gamma$ RIIIA) con respecto a un Fc $\gamma$ R inhibidor (como Fc $\gamma$ RIIB):

$$\text{Proporción de Afinidades} = \frac{\text{Cambio de tipo salvaje a variante en afinidad para Fc}\gamma\text{R}_{\text{Activadora}}}{\text{Cambio de tipo salvaje a variante en afinidad para Fc}\gamma\text{R}_{\text{Inhibidora}}}$$

Se prefieren particularmente las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, que poseen una región Fc variante (con respecto a la región Fc de tipo salvaje) en la que la región Fc variante tiene una proporción de afinidades mayor de 1. Tales moléculas tienen un uso particular en proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad,

trastorno o infección, o la mejora de un síntoma del mismo, donde se desea una eficacia mejorada de la función de la célula efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa. Por el contrario, una región Fc variante que tiene una proporción de afinidades de menos de 1 media la disminución de la eficacia de la función de la célula efectora. La **Tabla 1** enumera mutaciones ejemplares simples, dobles, triples, cuádruples y quíntuples según si su Proporción de Afinidades es mayor o menor que 1.

<b>Tabla 1</b> <b>Mutaciones simples y múltiples ejemplares enumeradas por proporción de afinidades</b>					
	<b>Simple</b>	<b>Doble</b>	<b>Triple</b>	<b>Cuádruple</b>	<b>Quíntuple</b>
<b>Proporción de afinidades &gt; 1</b>					
10	F243L	F243L y R292P	F243L, P247L y N421K	L234F, F243L, R292P y Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L
15	D270E	F243L y Y300L	F243L, R292P y Y300L	L235I, F243L, R292P y Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L y P396L
20	R292G	F243L y P396L	F243L, R292P y V305I	L235Q, F243L, R292P y Y300L	F243L, R292P, V305I, Y300L y P396L
25	R292P	D270E y P396L	F243L, R292P y P396L	F243L, P247L, D270E y N421K	
30		R292P y Y300L	F243L, Y300L y P396L	F243L, R255L, D270E y P396L	
35		R292P y V305I	P247L, D270E y N421K	F243L, D270E, G316D y R416G	
40		R292P y P396L	R255L, D270E y P396L	F243L, D270E, K392T y P396L	
45		Y300L y P396L	D270E, G316D y R416G	F243L, D270E, P396L y Q419H	
50		P396L y Q419H	D270E, K392T y P396L	F243L, R292P, Y300L y P396L	
			D270E, P396L y Q419H	F243L, R292P, V305I y P396L	
<b>Proporción de afinidades &lt; 1</b>					
45	Y300L	F243L y P396L	F243L, R292P y V305I		
50	P396L	P247L y N421K			
		R255L y P396L			
		R292P y V305I			
		K392T y P396L			
		P396L y Q419H			

En una realización específica, en las regiones Fc variantes, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 o 330 y preferiblemente uno o más de los siguientes residuos: A240, 1240, L241, L243, H244, N298, 1328 o V330. En una realización específica diferente, en las regiones Fc variantes, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 y preferiblemente uno o más de los siguientes residuos: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 o L300.

En una realización preferida, en las regiones Fc variantes que se unen a un FcγR con una afinidad alterada, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Preferiblemente, la variante Región Fc tiene cualquiera de los siguientes residuos:

A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 o A430.

5 En una realización diferente, en las regiones Fc variantes que se unen a un FcγR (a través de su región Fc) con una afinidad reducida, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439.

10 En una realización diferente, en las regiones Fc variantes que se unen a un FcγR (a través de su región Fc) con una afinidad mejorada, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430. En un caso diferente, en las regiones Fc variantes que une FcγRIIA con una afinidad mejorada, cualquiera de los siguientes residuos: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 o A430.

15 Las variantes preferidas incluyen una o más modificaciones en cualquiera de las posiciones: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 o 332.

Las variantes particularmente preferidas incluyen una o más modificaciones seleccionadas de los grupos A-Al:

20	A	228E, 228K, 228Y o 228G;
	B	230A, 230E, 230Y o 230G;
	C	231E, 231K, 231Y, 231P o 231G;
	D	232E, 232K, 232Y, 232G;
25	E	233D;
	F	234I o 234F;
	G	235D, 235Q, 235P, 235I o 235V;
	H	239D, 239E, 239N o 239Q;
30	I	240A, 240I, 240M o 240T;
	J	243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H o 243I;
	K	244H;
	L	245A;
	M	247G, 247V o 247L;
35	N	262A, 262E, 262I, 262T, 262E o 262F;
	O	263A, 263I, 263M o 263T;
	P	264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T o 264W;
	Q	265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N o 265Q;
40	R	266A, 266I, 266M o 266T;
	S	271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W o 271G;
	T	273I;
45	U	275L o 275W;
	V	281D, 281K, 281Y o 281P;
	W	284E, 284N, 284T, 284L, 284Y o 284M;
	X	291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I o 291G;
50	Y	299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W o 299Y;
	Z	302I;
	AA	304D, 304N, 304T, 304H o 304L
	AB	305I;
55	AC	313F;
	AD	323I;
	AE	325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W o 325P;
60	AF	328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M o 328N;
	AG	330L, 330Y, 330I o 330V;
	AH	332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G o 332Y; y
65	AI	336E, 336K o 336Y

Las variantes todavía más particularmente preferidas incluyen una o más modificaciones seleccionadas de los Grupos 1-105:

	Grupo	Variante		Grupo	Variante
5	1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E	
	2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E	
	3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E	
10	4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E	
	5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D	
	6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E	
	7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I	
15	8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N	
	9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q	
	10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E	
	11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y	
20	12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T	
	13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E	
	14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D	
25	15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E	
	16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E	
	17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E	
30	18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E	
	19	P243L / V264I	72	S239E / D265N	
	20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q	
	21	L328E / I332E	74	S239E / I332D	
35	22	L328H / I332E	75	S239E / I332E	
	23	L328I / I332E	76	S239E / I332N	
	24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q	
	25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E	
	26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332E	
40	27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332E	
	28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E	
	29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E	
	30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E	
45	31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D	
	32	N297D / S298A / A330Y / I332E	85	S239N / I332E	
	33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N	
	34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q	
50	35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E	
	36	Grupo Variante	36	Grupo Variante	
		N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D	
	37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E	
55	38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N	
	39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q	
	40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E	
	41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E	
60	42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E	
	43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E	
	44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E	
	45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E	
65	46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E	

(continuación)

Grupo	Variante	Grupo	Variante
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332 E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

En una realización, una molécula de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenderá una Región Fc variante que tiene por lo menos una modificación en la Región Fc. En ciertas realizaciones, la región Fc variante comprende por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

En una realización específica, la región Fc variante comprende:

- (A) por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L;
- (B) por lo menos dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:
- (1) F243L y P396L;  
 (2) F243L y R292P; y  
 (3) R292P y V305I;
- (C) por lo menos tres sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:
- (1) F243L, R292P e Y300L;  
 (2) F243L, R292P y V305I;  
 (3) F243L, R292P y P396L; y  
 (4) R292P, V305I y P396L;
- (D) por lo menos cuatro sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:
- (1) F243L, R292P, Y300L y P396L; y  
 (2) F243L, R292P, V305I y P396L; o
- (E) por lo menos las cinco sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:
- (1) F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L; y  
 (2) L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L.

En otra realización específica, la región Fc variante comprende sustituciones de:

- (A) F243L, R292P e Y300L;  
 (B) L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L; o  
 (C) F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

En una realización, una molécula de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprende una región Fc variante que muestra unión disminuida (o sustancialmente nula) a FcYRIA (CD64), FcYRIIA (CD32A), FcYRIIB (CD32B), FcYRIIIA (CD16a) o FcYRIIIB. (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de IgG1 de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 1**)). En una realización, una molécula de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenderá una región Fc variante que muestra unión reducida (o sustancialmente nula) para un FcYR (por ejemplo, FcYRIIIA) y función efectora de ADCC reducida (o sustancialmente nula). En ciertas realizaciones, la región Fc variante comprende por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de L234A, L235A, D265A, N297Q y N297G. En una realización específica, la región Fc variante comprende la sustitución de L234A; L235A; L234A y L235A; D265A; N297Q o N297G.

Una secuencia de IgG1 preferida para los dominios CH2 y CH3 de las moléculas de unión a PD-1 de la invención tendrá las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO: 5**):

5 APEAAGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 10 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQOPENN YKTPPPVLDs DGSFFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 15 ALHNHYTQKS LSLSPGX

en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

15 En una realización diferente, una molécula de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprende una región Fc que muestra inherentemente una unión disminuida (o sustancialmente nula) a FcγRIIA (CD16a) y/o una función efectora reducida (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de tipo salvaje de IgG1 (**SEQ ID NO: 1**)). En una realización específica, una molécula de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprende una región Fc de IgG2 (**SEQ ID NO: 2**) o una región Fc de IgG4 (**SEQ ID: NO: 4**). Cuando se utiliza una región Fc de IgG4, la presente invención también abarca la introducción de una mutación estabilizadora, como la sustitución S228P de la región bisagra de IgG4 (ver, por ejemplo, la **SEQ ID NO: 13**: ESKYGPPCPP P, (Lu et al., (2008)) "The Effect Of A PointMutation On The Stability Of IgG4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation", J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969) para reducir la incidencia de intercambio de cadenas. Pueden introducirse en una región Fc de IgG4 otras mutaciones estabilizadoras conocidas en la técnica (Peters, P et al., (2012) "Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability", J. Biol. Chem., 287:24525-24533; Publicación de patente de PCT N°: WO 2008/145142).

20 En otras realizaciones, la invención abarca el uso de cualquier región Fc variante conocida en la técnica, como las divulgadas en Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγR: Current Models," Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function," Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R," J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) "Mapping Of The Clq Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc," J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. et al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking FcγR I Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. et al. (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors," FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo," Transplantation 57:1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11," Mol. Immunol. 29:53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG," J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG," Nature 332:563-564; Patentes de Estados Unidos N° 5.624.821; 5.885.573; 6.194.551; 7.276.586; y 7.317.091; y Publicaciones de PCT WO 00/42072 y PCT WO 99/58572.

25 En algunas realizaciones, las moléculas de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden además uno o más sitios de glicosilación, de tal manera que una o más fracciones de carbohidratos se unen covalentemente a la molécula. Preferiblemente, las moléculas de la invención con uno o más sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la Región Fc confieren o tienen una función efectora mediada por anticuerpos mejorada, por ejemplo, actividad de ADCC mejorada, en comparación con el anticuerpo no modificado. En algunas realizaciones, la divulgación comprende además moléculas que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que se sabe directa o indirectamente que interactúan con una fracción de carbohidrato de la región Fc incluyendo, pero no limitado a, los aminoácidos en las posiciones 241, 243, 244, 245, 246, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 y 301. Los aminoácidos que interactúan directa o indirectamente

con una fracción de carbohidrato de una región Fc son conocidos en la técnica, ver, por ejemplo, Jefferis et al., 1995 Immunology Letters, 44: 111-7.

En otra realización, la invención abarca moléculas que se han modificado introduciendo uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de las moléculas, preferiblemente sin alterar la funcionalidad de las moléculas, por ejemplo, actividad de unión al antígeno objetivo o FcγR. Pueden introducirse sitios de glicosilación en la región variable y/o constante de las moléculas de la invención. Como se usa en la presente, los "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo al que se unirá específica y covalentemente un oligosacárido (es decir, los carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples enlazados entre sí). Las cadenas laterales de oligosacáridos están típicamente unidas a la estructura principal de un anticuerpo mediante enlaces N u O. La glicosilación N-enlazada se refiere a la unión de una fracción de oligosacárido a la cadena lateral de una fracción de asparagina. La glicosilación O-enlazada se refiere a la unión de una fracción de oligosacárido a un hidroxiaminoácido, por ejemplo, serina, treonina. Las moléculas de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, incluyendo los sitios de glicosilación N-enlazados y O-enlazados. Puede usarse cualquier sitio de glicosilación para la glicosilación N-enlazada u O-enlazada conocido en la técnica de acuerdo con la presente divulgación. Un ejemplo de sitio de glicosilación N-enlazado que es útil de acuerdo con los métodos de la presente invención es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en donde X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Tal sitio o sitios pueden introducirse en una molécula de la divulgación usando métodos bien conocidos en la técnica a los que pertenece esta divulgación (ver, por ejemplo, IN VITRO MUTAGENESIS, RECOMBINANT DNA: A SHORT COURSE, J. D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, New York, 1983, capítulo 8, págs. 106-116.) Un método ejemplar para introducir un sitio de glicosilación en una molécula de la invención puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos de la molécula de tal manera que se obtenga la secuencia Asn-X-Thr/Ser deseada.

Los métodos para modificar el contenido de carbohidratos de los anticuerpos (y moléculas que comprenden dominios de anticuerpos, por ejemplo, Región Fc) son bien conocidos en la técnica, ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 6.218.149; EP 0 359096 B1; Publicación de Estados Unidos Nº US 2002/0028486; WO 03/035835; Publicación de Estados Unidos Nº 2003/0115614; Patente de Estados Unidos Nº 6.218.149; Patente de Estados Unidos Nº 6.472.511. Métodos para modificar el contenido de carbohidratos de una molécula de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, eliminando una o más fracciones de carbohidratos endógenos de la molécula o desplazamiento del sitio de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, modificando posiciones adyacentes a 297. La posición 296 se puede modificar, de tal manera que la posición 296 y no la posición 297 esté glicosilada.

La función efectora también puede modificarse mediante técnicas como la introducción de uno o más residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo que se produzca la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región, lo que da como resultado la generación de un anticuerpo homodimérico que puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o muerte celular mediada por el complemento aumentada y ADCC (Caron, P.C. et al. (1992) "Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies", J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shope, B. (1992) "A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity," J. Immunol. 148(9):2918-2922. También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff, E.A. et al. (1993) "Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice," Cancer Research 53:2560-2565. Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y puede por lo tanto tener capacidades mejoradas de lisis del complemento y de ADCC (Stevenson, G.T. et al. (1989) "A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge", Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

La vida media en suero de las moléculas de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, que comprenden regiones Fc puede aumentarse aumentando la afinidad de unión de la región Fc por FcRn. El término "vida media" como se usa en la presente significa una propiedad farmacocinética de una molécula que es una medida del tiempo medio de supervivencia de las moléculas después de su administración. La vida media puede expresarse como el tiempo necesario para eliminar el cincuenta por ciento (50%) de una cantidad conocida de la molécula del cuerpo de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano u otro mamífero) o un compartimento específico del mismo, por ejemplo, según se mide en suero, es decir, vida media circulante, o en otros tejidos. En general, un aumento de la vida media da como resultado un aumento del tiempo medio de residencia (MRT) en circulación para la molécula administrada.

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicha molécula tiene una vida media aumentada (con respecto a una región Fc de tipo salvaje).

En algunas realizaciones, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y

para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución de aminoácidos que extiende la vida media en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 y 436. En la técnica se conocen numerosas mutaciones específicas capaces de aumentar la vida media de una molécula que contiene la región Fc e incluyen, por ejemplo, M252Y, S254T, T256E y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, ver las mutaciones descritas en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.277.375, 7.083.784; 7.217.797, 8.088.376; Publicaciones de Estados Unidos Nº 2002/0147311; 2007/0148164; y Publicaciones internacionales Nº WO 98/23289; WO 2009/058492; y WO 2010/033279. Las moléculas que contienen la región Fc con una vida media mejorada también incluyen aquellas con sustituciones en dos o más de los residuos de la región Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 y 436. En particular, dos o más sustituciones seleccionadas de: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K e Y436I.

En una realización específica, la región Fc variante comprende sustituciones de:

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

Regiones Fc variantes pueden comprender:

- (A) una o más mutaciones que alteran la función efectora y/o FcγR; y
- (B) una o más mutaciones que prolongan la vida media en suero.

## VI. Moléculas de unión a anti-PD-1 humana biespecíficas

Son divulgadas, pero no reivindicadas moléculas de unión biespecíficas que son capaces de unirse a un **"primer epítopo"** y un **"segundo epítopo"**, en donde el primer epítopo es un epítopo de PD-1 humana y el segundo epítopo es el mismo o diferente epítopo de PD-1, o es un epítopo de otra molécula que está presente en la superficie de una célula inmunitaria (como un linfocito T) y participa en la regulación de un punto de control inmunológico. En un caso, el segundo epítopo es un epítopo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectina-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 o VISTA. En un caso, el segundo epítopo no es un epítopo de PD-1. En un caso específico, el segundo epítopo es CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT o TIM-3. En ciertos casos, una molécula biespecífica comprende más de dos sitios de unión a epítopos. Tales moléculas biespecíficas pueden unirse a dos o más epítopos diferentes de LAG-3 y por lo menos a un epítopo de una molécula que no es LAG-3.

Anticuerpos biespecíficos pueden ser capaces de unirse simultáneamente a PD-1 y al segundo epítopo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). En algunos casos, el anticuerpo biespecífico capaz de unirse simultáneamente a PD-1 y el segundo epítopo se produce usando cualquiera de los métodos descritos en las Publicaciones de PCT Nº WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO 2010/028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873, y WO 2014/022540.

### A. Diacuerpos biespecíficos que carecen de regiones Fc

Son divulgados, pero no reivindicados diacuerpos biespecíficos que comprenden, y más preferiblemente están compuestos por, una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, cuyas secuencias permiten que las cadenas polipeptídicas se unan covalentemente entre sí para formar un diacuero asociado covalentemente que es capaz de unirse simultáneamente a un primer epítopo y a un segundo epítopo, tales epítopos no siendo idénticos entre sí. Tales diacuerpos biespecíficos comprenden por tanto dominios **"VL1"|"VH1"** que son capaces de unirse al primer epítopo y dominios **"VL2"|"VH2"** que son capaces de unirse al segundo epítopo. La notación **"VL1"** y **"VH1"** indican, respectivamente, el dominio de cadena ligera variable y el dominio de cadena pesada variable que se unen al "primer" epítopo de dicho diacuero biespecífico. De manera similar, la

notación "VL2" y "VH2" indica, respectivamente, el dominio de cadena ligera variable y el dominio de cadena pesada variable que se unen al "segundo" epítopo de dicho diacuerpo biespecífico. Es irrelevante si un epítopo particular se designa como el primer o el segundo epítopo; teniendo dicha notación relevancia sólo con respecto a la presencia y orientación de los dominios de las cadenas polipeptídicas de las moléculas de unión. Uno de tales epítopos es un epítopo de PD-1 y el otro de tales epítopos no es un epítopo de PD-1 (por ejemplo, un epítopo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR TIM-3, etc.).

El dominio VL de la primera cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH de la segunda cadena polipeptídica para formar un primer sitio de unión al antígeno funcional que es específico para un primer antígeno (es decir, o PD-1 o un antígeno que contiene el segundo epítopo). De igual manera, el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH de la primera cadena polipeptídica para formar un segundo sitio funcional de unión al antígeno que es específico para un segundo antígeno (es decir, o un antígeno que contiene el segundo epítopo o PD-1). Por tanto, la selección de los dominios VL y VH de la primera y segunda cadenas polipeptídicas está coordinada, de tal manera que las dos cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprenden colectivamente los dominios VL y VH capaces de unirse tanto a un epítopo de PD-1 como al segundo epítopo (es decir, comprenden VL<sub>PD-1</sub>/VH<sub>PD-1</sub> y VL2/VH2, en donde PD-1 es el "primer" epítopo, o VL1/VH1 y VL<sub>PD-1</sub>/VH<sub>PD-1</sub>, en donde PD-1 es el "segundo" epítopo).

La primera cadena polipeptídica de un caso de tales diacuerpos biespecíficos comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N-terminal, el Dominio VL1 de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al primer o segundo epítopo (es decir, ya sea VL<sub>PD-1</sub> o VL<sub>Epítopo 2</sub>), un primer péptido espaciador intermedio (Conector 1), un Dominio VH2 de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al segundo epítopo (si dicha primera cadena polipeptídica contiene VL<sub>PD-1</sub>) o al primero epítopo (si dicha primera cadena polipeptídica contiene el VL<sub>Epítopo 2</sub>), un segundo péptido espaciador intermedio (Conector 2) que contiene opcionalmente un residuo de cisteína, un dominio promotor de heterodímero y un extremo C-terminal (**Figura 1**).

La segunda cadena polipeptídica de este caso de diacuerpos biespecíficos comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N-terminal, un Dominio VL2 de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 o al segundo epítopo (es decir, VL<sub>PD-1</sub> o VL<sub>Epítopo 2</sub>, y el dominio VL no siendo seleccionado para su inclusión en la primera cadena polipeptídica del diacuerpo), un péptido conector intermedio (Conector 1), un dominio VH1 de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse o al segundo epítopo (si dicha segunda cadena polipeptídica contiene VL<sub>PD-1</sub>) o PD-1 (si dicha segunda cadena polipeptídica contiene VL<sub>Epítopo 2</sub>), un segundo péptido espaciador intermedio (Conector 2) que contiene opcionalmente un residuo de cisteína, un dominio promotor de heterodímero y un extremo C-terminal (**Figura 1**).

Más preferiblemente, la longitud del péptido conector intermedio (por ejemplo, Conector 1) que separa dichos dominios VL y VH se selecciona para evitar sustancial o completamente que los dominios VL y VH de la cadena polipeptídica se unan entre sí. Por tanto, los dominios VL y VH de la primera cadena polipeptídica son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. De igual manera, los dominios VL y VH de la segunda cadena polipeptídica son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. Un péptido espaciador intermedio preferido (Conector 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 14**): GGGSGGGGG.

La longitud y composición del segundo péptido conector intermedio (Conector 2) se selecciona basándose en la elección de dominios promotores de heterodímeros. Típicamente, el segundo péptido conector intermedio (Conector 2) comprenderá de 3 a 20 residuos de aminoácidos. En particular, cuando los dominios promotores de heterodímeros no comprenden un residuo de cisteína, se utiliza un segundo péptido conector intermedio que contiene cisteína (Conector 2). Un segundo péptido espaciador intermedio que contiene cisteína (Conector 2) contendrá 1, 2, 3 o más cisteínas. Un péptido espaciador que contiene cisteína preferido (Conector 2) tiene la secuencia **SEQ ID NO: 15**: GGCGGG. Alternativamente, el Conector 2 no comprende una cisteína (por ejemplo, GGG, GGGS (**SEQ ID NO: 29**), LGGGSG (**SEQ ID NO: 261**), GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO: 262**), ASTKG (**SEQ ID NO: 30**), LEPKSS (**SEQ ID NO: 33**), APSSS (**SEQ ID NO: 34**), etc.) y un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína, como se describe a continuación. Opcionalmente, se usan tanto un Conector 2 que contiene cisteína como un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína.

Los dominios promotores de heterodímeros pueden ser GVEPKSC (**SEQ ID NO: 16**) o VEPKSC (**SEQ ID NO: 17**) o AEPKSC (**SEQ ID NO: 18**) en una cadena polipeptídica y GFNRGEC (**SEQ ID NO: 19**) o FNRGEC (**SEQ ID NO: 18**) ID NO: 20) en la otra cadena polipeptídica (US2007/0004909).

Más preferiblemente, sin embargo, los dominios promotores de heterodímeros de tales diacuerpos se forman a partir de uno, dos, tres o cuatro dominios helicoidales repetidos en tandem de carga opuesta que comprenden una secuencia de por lo menos seis, por lo menos siete o por lo menos ocho residuos de aminoácidos de tal manera que el dominio promotor de heterodímeros posee una carga neta (Apostolovic, B. et al. (2008) "pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil," *Biomacromolecules* 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) "Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric

Coiled-coil Domain," J. Molec. Biol. 312:221-228; Arndt, K.M. et al. (2002) "Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils," Structure 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) "Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions," Analytical Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. et al. (2004) "Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy," J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) "Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding," Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodríguez, J. et al. (2012) "Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag," Protein Science 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) "End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures," Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008) "Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions," Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002) "Designing Heterodimeric Two-Stranded  $\alpha$ -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And  $\alpha$ -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity," J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. et al. (2012) "The d'-d-d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'-a-a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif," J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626-2633; Straussman, R. et al. (2007) "Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface," J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. et al. (2002) "Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance," J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) "The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies," Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008) "A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism," J. Gene Med. 10:355-367).

Tales dominios helicoidales repetidos pueden ser repeticiones exactas o pueden tener sustituciones. Por ejemplo, el dominio helicoidal del dominio promotor de heterodímero de la primera cadena polipeptídica puede comprender una secuencia de ocho residuos de aminoácidos seleccionados para conferir una carga negativa a dicho dominio promotor de heterodímeros, y el dominio helicoidal del dominio promotor de heterodímeros de la segunda cadena polipeptídica puede comprender una secuencia de ocho residuos de aminoácidos seleccionados para conferir una carga positiva a dicho dominio promotor de heterodímeros. Es indiferente qué la espiral se proporcione a la primera o segunda cadenas polipeptídicas, siempre que se use una espiral de carga opuesta para la otra cadena polipeptídica. El aminoácido cargado positivamente puede ser lisina, arginina, histidina, etc. y/o el aminoácido cargado negativamente puede ser ácido glutámico, ácido aspártico, etc. El aminoácido cargado positivamente es preferiblemente lisina y/o el aminoácido cargado negativamente es preferiblemente ácido glutámico. Es posible que solo se emplee un único dominio promotor de heterodímeros (ya que dicho dominio inhibirá la homodimerización y, por lo tanto, promoverá la heterodimerización), sin embargo, se prefiere que tanto la primera como la segunda cadena polipeptídica de los diacuerpos de la presente divulgación contengan dominios promotores de la heterodimerización.

En un caso preferido, uno de los dominios promotores de heterodímeros comprenderá cuatro dominios helicoidales "espiral E" en tándem (**SEQ ID NO: 21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**), cuyos residuos de glutamato formarán una carga negativa a pH 7, mientras que el otro de los dominios promotores de heterodímeros comprenderá cuatro dominios en tándem "espiral K" (**SEQ ID NO: 22: KVAALK-E-KVAALK-E-KVAALK-E-KVAALK-E**), cuyos residuos de lisina formarán una carga positiva a pH 7. La presencia de tales dominios cargados promueve la asociación entre el primer y el segundo polipéptidos y, por tanto, fomenta la formación de heterodímeros. Se prefiere especialmente un dominio promotor de heterodímeros en el que uno de los cuatro dominios helicoidales "espiral E" en tándem de la **SEQ ID NO: 21** se ha modificado para contener un residuo de cisteína: **EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23)**. De igual manera, se prefiere especialmente un dominio promotor de heterodímeros en el que uno de los cuatro dominios helicoidales en tándem "espiral K" de la **SEQ ID NO: 22** se ha modificado para contener un residuo de cisteína: **KVAACKE-KVAALK-E-KVAALK-E-KVAALK-E (SEQ ID NO: 24)**.

Como se divulga en la WO 2012/018687, para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de los diacuerpos, puede modificarse un diacuerpo para que contenga una porción polipeptídica de una proteína de unión al suero en uno o más de los extremos terminales del diacuerpo. Lo más preferible, dicha porción de polipéptido de una proteína de unión a suero se instalará en el extremo C-terminal del diacuerpo. La albúmina es la proteína más abundante en plasma y tiene una vida media de 19 días en humanos. La albúmina posee varios sitios de unión a moléculas pequeñas que le permiten unirse no covalentemente a otras proteínas y, por lo tanto, extiende su vida media en suero. El dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa de Streptococcus G148 consta de 46 residuos de aminoácidos que forman un haz estable de tres hélices y tiene una amplia especificidad de unión a albúmina (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120. Por tanto, una porción polipeptídica particularmente preferida de una proteína de unión al suero para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de un diacuerpo es el dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína estreptocócica G, y más preferiblemente, el dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus dysgalactiae* (**SEQ ID NO: 25: LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP**).

Como se divulga en la WO 2012/162068, las variantes **"desinmunizadas"** de la SEQ ID NO: 25 tienen la capacidad de atenuar o eliminar la unión del MHC de clase II. En base a los resultados de la mutación combinacional, se considera que las siguientes combinaciones de sustituciones son sustituciones preferidas para formar tal ABD desinmunizado: ABD: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Las variantes de ABD que tienen las modificaciones L64A, I65A y D79A o las modificaciones N66S, T70S y D79A. Se prefieren particularmente los ABD desinmunizados variantes que tienen la secuencia de aminoácidos:

5 LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNNLID<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub>A<sub>71</sub>EGVKALIDEILAALP (SEQ ID NO: 26),

10 o la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA<sub>64</sub>A<sub>65</sub>NNAKT VEGVKALIA<sub>79</sub>EILAALP (SEQ ID NO: 27),

o la secuencia de aminoácidos:

15 LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNNLIS<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> VEGVKALIA<sub>79</sub>EILAALP (SEQ ID NO: 28),

ya que tales ABD desinmunizados muestran una unión sustancialmente de tipo salvaje a la vez que proporcionan una unión atenuada a MHC de clase II. Por tanto, la primera cadena polipeptídica de tal diacuerpo que tiene un ABD contiene un conector peptídico colocado preferiblemente en el extremo C terminal del dominio de la espiral E (o espiral K) de dicha cadena polipeptídica para intervenir entre el Dominio espiral E (o espiral K) y el ABD (que es preferiblemente un ABD desinmunizado). Una secuencia preferida para tal péptido conector es SEQ ID NO: 29: GGGS.

20

## B. Diacuerpos biespecíficos que contienen regiones Fc

Son divulgados, pero no reivindicados diacuerpos biespecíficos que comprenden una región Fc capaz de unirse simultáneamente a PD-1 y a un segundo epítopo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, 25 CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). La adición de un dominio CH2-CH3 de IgG a una o ambas cadenas polipeptídicas de diacuerpo, de tal manera que la formación de complejos de las cadenas de diacuerpo da como resultado la formación de una región Fc, aumenta la vida media biológica y/o altera la valencia del diabody. La incorporación de dominios CH2-CH3 de IgG en ambos polipéptidos de diacuerpo permitirá que se forme un diacuerpo biespecífico de dos cadenas que contiene la región Fc (**Figura 2**).

30

Alternativamente, la incorporación de dominios CH2-CH3 de IgG en solo uno de los polipéptidos de diacuerpo permitirá que se forme un diacuerpo más complejo de cuatro cadenas biespecífico que contenga la región Fc (**Figuras 3A-3C**). La **Figura 3C** muestra un diacuerpo de cuatro cadenas representativo que posee el dominio ligero constante (CL) y el dominio CH1 pesado constante, sin embargo, pueden emplearse alternativamente fragmentos de tales dominios, así como otros polipéptidos (ver, por ejemplo, las **Figuras 3A y 3B**, Publicaciones de patente de Estados Unidos Nº 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicaciones de Patente Europea Nº EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT Nº WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Así, por ejemplo, en lugar del dominio CH1, puede emplearse un péptido que tenga la secuencia de aminoácidos GVEPKSC (SEQ ID NO: 16) VEPKSC (SEQ ID NO: 17), o AEPKSC (SEQ ID NO: 18), derivada del dominio bisagra de una IgG humana, y en lugar del dominio CL, pueden emplearse los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, GFNRGEC (SEQ ID NO: 19) o FNRGEC (SEQ ID NO: 20). En la se muestra **Figura 3A** Un péptido representativo que contiene diacuerpo de cuatro cadenas. Alternativamente, o además, puede emplearse un péptido que comprende dominios helicoidales en tandem de carga opuesta, como los dominios helicoidales "espiral E" (SEQ ID NO: 21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK o SEQ ID NO: 23: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); y los dominios "espiral K" (SEQ ID NO: 22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE o SEQ ID NO: 24: KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). En la **Figura 3B** se muestra un dominio espiral representativo que contiene diacuerpo de cuatro cadenas.

40

Las moléculas de diacuerpo que contienen la región Fc incluyen generalmente péptidos conectores intermedios adicionales (Conejadores). Típicamente, los conectores adicionales comprenderán de 3 a 20 residuos de aminoácidos. Los conectores adicionales o alternativos que pueden emplearse en las moléculas de diacuerpo que contienen la región Fc de la presente divulgación incluyen: GGGS (SEQ ID NO: 29), LGGGSG (SEQ ID NO: 261), GGGSGGGGGGG (SEQ ID NO: 262), ASTKG (SEQ ID NO: 30), DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 31), EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 32), LEPKSS (SEQ ID NO: 33), APSSS (SEQ ID NO: 34) y APSSSPME (SEQ ID NO: 35), LEPKSADKTHTCPPCSEQ ID NO: 36), GGC y GGG. Puede usarse la SEQ ID NO: 33 en lugar de GGG o GGC para facilitar la clonación. Además, los aminoácidos GGG, o la SEQ ID NO: 33 pueden ir seguidos inmediatamente de la SEQ ID NO: 31 para formar los conectores alternativos: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 263); y LEPKSSDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 37). La molécula de diacuerpo que contiene la región Fc de la presente divulgación puede incorporar una región bisagra de IgG además de o en lugar de un conector. Las regiones bisagra ejemplares incluyen: EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 32) de IgG1, ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 11) de IgG2, ESKYGPSCP (SEQ ID NO: 12) de IgG4 y ESKYGPSCP (SEQ ID NO: 13) una variante de bisagra de IgG4 que comprende un sustituto estabilizador para reducir el intercambio de cadenas.

50

Como se proporciona en la **Figura 3A-3C**, los diacuerpos pueden comprender cuatro cadenas diferentes. 55 La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de dicho diacuerpo contienen tres dominios: (i) un dominio que

5 contiene VL1, (ii) un dominio que contiene VH2, (iii) un dominio promotor de heterodímeros y (iv) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas contienen: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio promotor de heterodímeros, donde los dominios promotores de heterodímeros promueven la dimerización de la primera/tercera cadenas polipeptídicas con la segunda/cuarta cadenas polipeptídicas. Los dominios VL y/o VH de la tercera y la cuarta cadenas polipeptídicas, y los dominios VL y/o VH de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión tetravalente que sea monoespecífica, biespecífica o tetraespecífica. La notación "VL3" y "VH3" denotan, respectivamente, el dominio de cadena ligera variable y el dominio de cadena pesada variable que se unen al "tercer" epítopo de dicho diacuerpo. De manera similar, la notación "VL4" y "VH4" denotan, respectivamente, el dominio de cadena ligera variable y el dominio de cadena pesada variable que se unen al "cuarto" epítopo de dicho diacuerpo. La estructura general de las cadenas polipeptídicas de un diacuerpo que contiene la Región Fc de cuatro cadenas representativa de la divulgación se proporciona en la **Tabla 2**:

<b>Tabla 2</b>		
Biespecífico	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
Tetraespecífico	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	4 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL4-VH3-HPD-COOH
HPD = dominio promotor de heterodímeros		

25 En un caso específico, los diacuerpos son biespecíficos, tetravalentes (es decir, poseen cuatro sitios de unión al epítopo), diacuerpos que contienen Fc (**Figuras 3A-3C**) que se componen de cuatro cadenas polipeptídicas totales. Los diacuerpos biespecíficos, tetravalentes, que contienen Fc de la divulgación comprenden dos sitios de unión al epítopo inmunoespecíficos para PD-1 (que pueden ser capaces de unirse al mismo epítopo de PD-1 o a diferentes epítopos de PD-1), y dos sitios de unión de epítopo específicos para un segundo epítopo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

35 En un caso adicional, los diacuerpos que contienen la Región Fc biespecífica pueden comprender tres cadenas polipeptídicas. El primer polipéptido de dicho diacuerpo contiene tres dominios: (i) un dominio que contiene VL1, (ii) un dominio que contiene VH2 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. El segundo polipéptido de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena polipeptídica del diacuerpo. 40 El tercer polipéptido de tales diacuerpos comprende una secuencia CH2-CH3. Por tanto, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos se asocian entre sí para formar un sitio de unión VL1/VH1 que es capaz de unirse al primer epítopo, así como un sitio de unión VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítopo. El primer y el segundo polipéptidos están unidos entre sí a través de un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína en sus terceros dominios respectivos. En particular, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas forman complejos entre sí para formar una región Fc que se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Tales diacuerpos tienen 45 una potencia mejorada. Las **Figuras 4A** y **4B** ilustran las estructuras de tales diacuerpos. Tales diacuerpos biespecíficos que contienen la región Fc pueden tener dos orientaciones (**Tabla 3**):

<b>Tabla 3</b>		
Primera orientación	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
Segunda orientación	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-COOH
Segunda orientación	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
HPD = dominio promotor de heterodímeros		

60 En un caso específico, los diacuerpos son diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, bivalentes (es decir, poseen dos sitios de unión al epítopo) (**Figuras 4A-4B**) que se componen de tres cadenas polipeptídicas totales. Los diacuerpos bivalentes que contienen Fc biespecíficos de la divulgación comprenden un sitio de unión al epítopo inmunoespecífico para PD-1 y un sitio de unión al epítopo específico para un segundo epítopo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

En un caso adicional, los diacuerpos que contienen la región Fc biespecífica pueden comprender un total de cinco cadenas polipeptídicas. En un caso particular, dos de dichas cinco cadenas polipeptídicas tienen la misma secuencia de aminoácidos. La primera cadena polipeptídica de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La primera cadena polipeptídica puede ser la cadena pesada de un anticuerpo que contiene una VH1 y una región constante de cadena pesada. La segunda y la quinta cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos contienen: (i) un dominio que contiene VL1 y (ii) un dominio que contiene CL. La segunda y/o la quinta cadena polipeptídica de tales diacuerpos pueden ser cadenas ligeras de un anticuerpo que contiene una VL1 complementaria a la VH1 de la primera/tercera cadena polipeptídica. La primera, la segunda y/o la quinta cadena polipeptídica pueden aislarse a partir de anticuerpos de origen natural. Alternativamente, pueden construirse de recombinantemente. La tercera cadena polipeptídica de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1, (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3, (iv) un dominio que contiene VL2, (v) un dominio que contiene VH3 y (vi) un dominio promotor de heterodímeros, donde los dominios promotores de heterodímeros promueven la dimerización de la tercera cadena con la cuarta cadena. El cuarto polipéptido de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VL3, (ii) un dominio que contiene VH2 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo.

Por tanto, la primera y la segunda, y la tercera y la quinta, cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos se asocian entre sí para formar dos sitios de unión de VL1/VH1 capaces de unirse a un primer epítopo. La tercera y la cuarta cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos se asocian entre sí para formar un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse a un segundo epítopo, así como un sitio de unión de VL3/VH3 que es capaz de unirse a un tercer epítopo. El primer y el tercer polipéptidos están unidos entre sí a través de un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína en sus respectivas regiones constantes. En particular, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas forman un complejo entre sí para formar una Región Fc. Tales diacuerpos tienen una potencia mejorada. La **Figura 5** ilustra la estructura de tales diacuerpos. Se entenderá que los dominios VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3 pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión monoespecífica, biespecífica o triespecífica. Sin embargo, como se proporciona en la presente, estos dominios se seleccionan preferiblemente para unir PD-1 y un segundo epítopo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

Los dominios VL y VH de las cadenas polipeptídicas se seleccionan para formar sitios de unión VL/VH específicos para un epítopo deseado. Los sitios de unión VL/VH formados por la asociación de las cadenas polipeptídicas pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión tetravalente que sea monoespecífica, biespecífica, triespecífica o tetraespecífica. En particular, los dominios VL y VH pueden seleccionarse de tal manera que un diacuerpo biespecífico pueda comprender dos sitios de unión para un primer epítopo y dos sitios de unión para un segundo epítopo, o tres sitios de unión para un primer epítopo y un sitio de unión para un segundo epítopo, o dos sitios de unión para un primer epítopo, un sitio de unión para un segundo epítopo y un sitio de unión para un tercer epítopo (como se muestra en la **Figura 5**). La estructura general de las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos que contienen la Región Fc de cinco cadenas representativos de la divulgación se proporciona en la **Tabla 4**:

Tabla 4		
45	Biespecífico (2x2)	2 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
		1 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
		3 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
		5 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
		4 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL2-VH2-HPD-COOH
50	Biespecífico (3x1)	2 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
		1 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
		3 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
		5 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
		4 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
55	Triespecífico (2x1x1)	2 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
		1 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
		3 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
		5 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH
		4 <sup>a</sup> Cadena NH <sub>2</sub> -VL3-VH2-HPD-COOH
60	HPD = dominio promotor de heterodímeros	
65		

En un caso específico, los diacuerpos son diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes (es decir, poseen cuatro sitios de unión al epítopo), que están compuestos por cinco cadenas polipeptídicas totales que tienen dos sitios de unión para un primer epítopo y dos sitios de unión para un segundo epítopo. En un caso, los diacuerpos biespecíficos, tetravalentes, que contienen Fc comprenden dos sitios de unión al epítopo inmunoespecíficos para PD-1 (que pueden ser capaces de unirse al mismo epítopo de PD-1 o a diferentes epítopos de PD-1) y dos sitios de unión a epítopo específicos para un segundo epítopo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). En otro caso, los diacuerpos biespecíficos, tetravalentes, que contienen Fc de la divulgación comprenden tres sitios de unión a epítopo inmunoespecíficos para PD-1 que pueden ser capaces de unirse al mismo epítopo de PD-1 o a diferentes epítopos de PD-1), y un sitio de unión a epítopo específico para un segundo epítopo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). En otro caso, los diacuerpos biespecíficos tetravalentes que contienen Fc de la divulgación comprenden un sitio de unión a epítopo inmunoespecífico para PD-1, y tres sitios de unión a epítopo específicos para un segundo epítopo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

### C. Moléculas de unión trivalentes biespecíficas que contienen regiones Fc

Son divulgadas, pero no reivindicadas moléculas de unión biespecíficas trivalentes, que comprenden una región Fc, y que son capaces de unirse simultáneamente a un primer epítopo, un segundo epítopo y un tercer epítopo, en donde por lo menos uno de tales epítopos no es idéntico a otro. Tales diacuerpos biespecíficos comprenden por tanto dominios "VL1"/"VH1" que son capaces de unirse al primer epítopo, dominios "VL2"/"VH2" que son capaces de unirse al segundo epítopo y dominios "VL3"/"VH3" que son capaces de unirse al tercer epítopo. En un caso, uno o dos de tales epítopos es un epítopo de PD-1 y otro (o el otro) de tales epítopos no es un epítopo de PD-1 (por ejemplo, un epítopo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Tales moléculas de unión trivalentes biespecíficas comprenden tres sitios de unión a epítopos, dos de los cuales son dominios de unión de tipo diacuerpo, que proporcionan el sitio de unión A y el sitio de unión B, y uno de los cuales es un dominio de unión de tipo no diacuerpo, que proporciona el sitio de unión C (ver, por ejemplo, las **Figuras 6A-6F**, y la Solicitud de PCT N°: PCT/US15/33081; y PCT/US15/33076).

Típicamente, las moléculas de unión trivalentes comprenderán cuatro cadenas polipeptídicas diferentes (ver las **Figuras 6A-6B**), sin embargo, las moléculas pueden comprender un número mayor o menor de cadenas polipeptídicas, por ejemplo fusionando tales cadenas polipeptídicas entre sí (por ejemplo, mediante un enlace peptídico) o dividiendo tales cadenas polipeptídicas para formar cadenas polipeptídicas adicionales, o asociando menos o cadenas polipeptídicas adicionales mediante enlaces disulfuro. Las **Figuras 6B-6F** ilustran este aspecto de la presente divulgación representando esquemáticamente tales moléculas que tienen tres cadenas polipeptídicas. Como se proporciona en las **Figuras 6A-6F**, las moléculas de unión trivalentes de la presente divulgación pueden tener orientaciones alternativas en las que los dominios de unión de tipo diacuerpo son N-terminales (**Figuras 6A, 6C y 6D**) o C-terminales (**Figuras 6B, 6E y 6F**) a una región FC.

En ciertos casos, la primera cadena polipeptídica de tales moléculas de unión trivalentes contiene: (i) un dominio que contiene VL1, (ii) un dominio que contiene VH2, (iii) un dominio promotor de heterodímeros, y (iv) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. Los dominios VL1 y VL2 están localizados N-terminales o C-terminales en el dominio que contiene CH2-CH3 como se presenta en la **Tabla 5 (Figuras 6A y 6B)**. La segunda cadena polipeptídica de tales casos contiene: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio promotor de heterodímeros. La tercera cadena polipeptídica de tales casos contiene: (i) un dominio que contiene VH3, (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La tercera cadena polipeptídica puede ser la cadena pesada de un anticuerpo que contiene una VH3 y una región constante de cadena pesada. El cuarto polipéptido de tales casos contiene: (i) un dominio que contiene VL3 y (ii) un dominio que contiene CL. La cuarta cadena polipeptídica puede ser una cadena ligera de un anticuerpo que contiene una VL3 complementaria a la VH3 de la tercera cadena polipeptídica. La tercera o cuarta cadenas polipeptídicas pueden aislarse de anticuerpos de origen natural. Alternativamente, pueden construirse recombinantemente, sintéticamente o mediante otros medios.

El dominio de cadena ligera variable de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas se separa de los dominios de cadena pesada variable de dichas cadenas polipeptídicas mediante un conector espaciador intermedio que tiene una longitud que es demasiado corta para permitir que sus dominios VL1/VH2 (o sus VL2/VH1) se asocien para formar un sitio de unión al epítopo capaz de unirse al primer o al segundo epítopo. Un péptido espaciador intermedio preferido (Conector 1) para este propósito tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 14**): GGGSGGGG. Otros dominios de las moléculas de unión trivalentes pueden estar separados por uno o más péptidos espaciadores intermedios, que comprenden opcionalmente un residuo de cisteína. En la presente se proporcionan conectores ejemplares útiles para la generación de moléculas de unión trivalentes y también se proporcionan en las Solicitud de PCT N°: PCT/US15/33081; y PCT/US15/33076. Por tanto, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas de

tales moléculas de unión trivalentes se asocian para formar un sitio de unión VL1/VH1 capaz de unirse a un primer epítopo, así como un sitio de unión VL2/VH2 que es capaz de unirse a un segundo epítopo. La tercera y la cuarta cadenas polipeptídicas de tales moléculas de unión trivalentes se asocian para formar un sitio de unión de VL3/VH3 que es capaz de unirse a un tercer epítopo. Se entenderá que los dominios VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3 pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión que sea monoespecífica, biespecífica o triespecífica.

Como se ha descrito anteriormente, las moléculas de unión trivalentes pueden comprender tres polipéptidos. Pueden obtenerse moléculas de unión trivalentes que comprenden tres cadenas polipeptídicas uniendo los dominios del cuarto polipéptido N-terminal al dominio que contiene VH3 del tercer polipéptido. Alternativamente, se utiliza una tercera cadena polipeptídica de una molécula de unión trivalente de la divulgación que contiene los siguientes tres dominios: (i) un dominio que contiene VL3, (ii) un dominio que contiene VH3 y (iii) un dominio que contiene un secuencia CH2-CH3, en donde la VL3 y la VH3 están separadas entre sí por un péptido espaciador intermedio que es lo suficientemente largo (por lo menos 9 o más residuos de aminoácidos) para permitir la asociación de estos dominios para formar un sitio de unión al epítopo.

Se entenderá que los dominios VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3 pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión monoespecífica, biespecífica o triespecífica. Sin embargo, como se proporciona en la presente, estos dominios se seleccionan preferiblemente para unir PD-1 y un segundo epítopo (o un segundo y tercer epítopo) (preferiblemente, tales epítopos son epítopos de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

En particular, los dominios VL y VH pueden seleccionarse de tal manera que una molécula de unión trivalente comprenda dos sitios de unión para un primer epítopo y uno para un segundo epítopo, o un sitio de unión para un primer epítopo y dos sitios de unión para un segundo epítopo, o un sitio de unión para un primer epítopo, un sitio de unión para un segundo epítopo y un sitio de unión para un tercer epítopo. La estructura general de las cadenas polipeptídicas de moléculas de unión trivalentes representativas de la divulgación se proporciona en las **Figuras 6A-6F** y en la **Tabla 5**:

Tabla 5		
1 <sup>a</sup> Orientación de Cuatro Cadenas	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	4 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL3-CL-COOH
2 <sup>a</sup> Orientación de Cuatro Cadenas	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-VL1-VH2-HPDCOOH
	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	4 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL3-CL-COOH
1 <sup>a</sup> Orientación de Tres Cadenas	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
2 <sup>a</sup> Orientación de Tres cadenas	2 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH
	1 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-VL1-VH2-HPDCOOH
	3 <sup>a</sup> Cadena	NH <sub>2</sub> -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
HPD = dominio promotor de heterodímeros		

Un caso se refiere a moléculas de unión trivalentes biespecíficas que comprenden dos sitios de unión a epítopo para PD-1 y un sitio de unión a epítopo para el segundo epítopo presente en una molécula distinta de PD-1 (por ejemplo, B7-H3, B7- H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Los dos sitios de unión a epítopo para PD-1 pueden unirse al mismo epítopo o a diferentes epítopos. Otro caso se refiere a moléculas de unión trivalentes biespecíficas que comprenden un sitio de unión a epítopo para PD-1 y dos sitios de unión a epítopo que se unen a un segundo antígeno presente en una molécula distinta de PD-1 (por ejemplo B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Los dos sitios de unión a epítopo para el segundo antígeno pueden unirse al mismo epítopo o diferentes epítopos del antígeno (por ejemplo, el mismo o diferentes epítopos de LAG-3). Como se ha proporcionado anteriormente, tales moléculas de unión trivalentes biespecíficas pueden comprender tres o cuatro cadenas polipeptídicas.

## VII. Dominios constantes y regiones Fc

En la presente se proporcionan dominios constantes de anticuerpos útiles en la generación de moléculas de unión a PD-1 (por ejemplo, anticuerpos, diacuerpos, moléculas de unión trivalentes, etc.).

Un dominio CL preferido es un dominio CL de Kappa de IgG humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CL Kappa humano ejemplar es (**SEQ ID NO: 8**):

5 RTVAAPSVDI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG  
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK  
SFNRGEC

10 Alternativamente, un dominio CL ejemplar es un dominio Lambda CL de IgG humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CL Kappa humano ejemplar es (**SEQ ID NO: 9**):

15 QPKAAPSVTI FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA  
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP  
TECS

20 Como se proporciona en la presente, las moléculas de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden comprender una Región Fc. La región Fc de tales moléculas de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, puede ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación 25 pueden comprender además un dominio CH1 y/o una región bisagra. Cuando está presente, el dominio CH1 y/o la región bisagra pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), y es preferiblemente del mismo isotipo que la región Fc deseada.

Un dominio CH1 ejemplar es un dominio CH1 de IgG1 humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CH1 de IgG1 humano ejemplar es (**SEQ ID NO: 10**):

30 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

35 Un dominio CH1 ejemplar es un dominio CH1 de IgG2 humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CH1 de IgG2 humano ejemplar es (**SEQ ID NO: 257**):

40 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

45 Un dominio CH1 ejemplar es un dominio CH1 de IgG4 humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CH1 de IgG4 humano ejemplar es (**SEQ ID NO: 254**):

50 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

55 Una región bisagra ejemplar es una región bisagra de IgG1 humana. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 32**): EPKSCDKTHCPCPC.

60 Otra región bisagra ejemplar es una región bisagra de IgG2 humana. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG2 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 11**): ERKCCVECPPCP.

65 Otra región bisagra ejemplar es una región bisagra de IgG4 humana. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG4 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 12**): ESKYGPPCPSCP. Como se describe en la presente, una región bisagra de IgG4 puede comprender una mutación estabilizadora como la sustitución S228P. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG4 estabilizada ejemplar es (**SEQ ID NO: 13**): ESKYGPPCPPCP.

66 La región Fc de las moléculas que contienen la región Fc puede ser o una región Fc completa (por ejemplo, una región Fc de IgG completa) o solo un fragmento de una región Fc. Opcionalmente, la región Fc de las moléculas que contienen la región Fc de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, carece del residuo de aminoácido de lisina C-terminal. En particular, la región Fc de las moléculas que contienen la región Fc de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, puede ser una región Fc variante modificada. Aunque la región Fc de las moléculas que

5 contienen la región Fc biespecífica de la presente divulgación puede poseer la capacidad de unirse a uno o más receptores Fc (por ejemplo., Fc $\gamma$ R(s)), más preferiblemente dicha región Fc variante tiene unión alterada a Fc $\gamma$ RIA (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32A), Fc $\gamma$ RIIB (CD32B), Fc $\gamma$ RIIA (CD16a) o Fc $\gamma$ RIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por una región Fc de tipo salvaje) o tendrán una capacidad sustancialmente reducida o nula para unirse al receptor o receptores inhibidores. Por tanto, la región Fc de las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación puede incluir parte o la totalidad del dominio CH2 y/o parte o la totalidad del dominio CH3 de una región Fc completa, o puede comprender una secuencia de CH2 variante y/o de CH3 variante (que puede incluir, por ejemplo, una o más inserciones y/o una o más delecciones con respecto a los dominios CH2 o CH3 de una región Fc completa). Tales regiones Fc pueden comprender porciones de polipéptidos que no son Fc, o pueden comprender porciones de regiones Fc no naturalmente completas, o pueden comprender orientaciones de origen no natural de dominios CH2 y/o CH3 (como, por ejemplo, dos dominios CH2 o dos dominios CH3, o en la dirección N-terminal a C-terminal, un dominio CH3 enlazado a un dominio CH2, etc.).

10 15 Las modificaciones de la región Fc identificadas como que altera la función efectora son conocidas en la técnica, incluyendo las modificaciones que aumentan la unión a los receptores activadores (por ejemplo, Fc $\gamma$ RIIA (CD16A) y reducen la unión a los receptores inhibidores (por ejemplo, Fc $\gamma$ RIIB (CD32B) (ver, por ejemplo, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcgamma Receptors", Cancer Res. 57(18):8882-8890). Las variantes ejemplares de regiones Fc de IgG1 humana con unión reducida a CD32B y/o unión aumentada a CD16A contienen sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I o P296L. Estas sustituciones de aminoácidos pueden estar presentes en una región Fc de IgG1 humana en cualquier combinación o subcombinación. En una realización, la variante de la región Fc de IgG1 humana contiene una sustitución F243L, R292P e Y300L. En otra realización, la variante de la región Fc de IgG1 humana contiene sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P296L.

20 25 En particular, se prefiere que las regiones Fc de las cadenas polipeptídicas de las moléculas que contienen la región Fc de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, muestren una unión disminuida (o sustancialmente nula) a Fc $\gamma$ RIA (CD64), Fc $\gamma$ RIIA (CD32A), Fc $\gamma$ RIIB (CD32B), Fc $\gamma$ RIIA (CD16a) o Fc $\gamma$ RIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de IgG1 de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 1**)). Las regiones Fc variantes y las formas mutantes capaces de mediar dicha unión alterada se han descrito anteriormente. En una realización específica, las moléculas que contienen la región Fc de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una región Fc de IgG que muestra una función efectora de ADCC reducida. En una realización preferida, el dominio CH2-CH3 de la primera y/o tercera cadenas polipeptídicas de tales moléculas que contienen la región Fc incluye 1, 2 o 3 cualquiera de las sustituciones: L234A, L235A, N297Q y N297G. En otra realización, la variante de la región Fc de IgG humana contiene una sustitución N297Q, una sustitución N297G, sustituciones L234A y L235A o una sustitución D265A, ya que estas mutaciones anulan la unión de FcR. Alternativamente, se utiliza un dominio CH2-CH3 de una región Fc que muestra inherentemente unión disminuida (os sutancialmente nula) a Fc $\gamma$ RIIA (CD16a) y/o función efectora reducida (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de IgG1 de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 1**))). En una realización específica, las moléculas que contienen la Región Fc de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, comprenden una Región Fc de IgG2 (**SEQ ID NO: 2**) o una región Fc de IgG4 (**SEQ ID: NO: 4**). Cuando se utiliza una región Fc de IgG4, la presente invención también abarca la introducción de una mutación estabilizadora, como la sustitución de la región bisagra S228P descrita anteriormente (ver, por ejemplo, **SEQ ID NO: 13**). Como las sustituciones N297G, N297Q, L234A, L235A y D265A suprimen la función efectora, en circunstancias en las que se desea la función efectora, preferiblemente no se emplearían estas sustituciones.

30 35 40 45 50 55 En particular, se prefiere que las regiones Fc de las cadenas polipeptídicas de las moléculas que contienen la región Fc de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, muestren una vida media en suero aumentada (con respecto a la vida media mostrada por la Fc de tipo salvaje correspondiente). Las regiones Fc variantes y las formas mutantes que muestran una vida media en suero prolongada se han descrito anteriormente. En una realización preferida, el dominio CH2-CH3 de la primera y/o la tercera cadenas polipeptídicas de tales moléculas que contienen la región Fc incluyen 1, 2 o 3 cualquiera de las sustituciones: M252Y, S254T y T256E. La invención además moléculas que contienen la región Fc de la presente invención que comprenden regiones Fc variantes que comprenden:

- 55 60 (A) una o más mutaciones que alteran la función efectora y/o Fc $\gamma$ R; y  
 (B) una o más mutaciones que prolongan la vida media en suero.

Una secuencia de IgG1 preferida para los dominios CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la región Fc de la presente invención comprenderá las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO: 258**):

5 APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT **LYITRE**PEVT CVVVDVSQED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKT K PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTPPPVLD S DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSPG**X**

10 en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

Una secuencia de IgG4 preferida para los dominios CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la región Fc de la presente invención comprenderá las sustituciones M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO: 259**):

15 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT **LYITRE**PEVT CVVVDVSQED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKT K PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 20 WESNGQPENN YKTPPPVLD S DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

25 Para diacuerpos y moléculas de unión trivalentes cuya primera y tercera cadenas polipeptídicas no son idénticas), es deseable reducir o evitar que se produzca la homodimerización entre los dominios CH2-CH3 de dos primeras cadenas polipeptídicas o entre los dominios CH2-CH3 de dos tercera cadenas polipeptídicas. No es necesario que los dominios CH2 y/o CH3 de tales cadenas polipeptídicas sean idénticas en secuencia, y ventajosamente se modifican para fomentar la formación de complejos entre las dos cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos (preferiblemente una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma un "botón", por ejemplo, triptófano) puede introducirse en el dominio CH2 o CH3 de tal manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio mutado de manera similar y obligará al dominio mutado a aparecerse con un dominio en el que se ha modificado una mutación complementaria o acomodativa, es decir, "el agujero" (por ejemplo, una sustitución con glicina). Tales conjuntos de mutaciones pueden modificarse en cualquier pareja de polipéptidos que comprendan dominios CH2-CH3 que formen una región Fc. Los métodos de modificación de proteínas para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto a la modificación de moléculas similares a inmunoglobulinas, y se incluyen en la presente (ver, por ejemplo, Ridgway et al. (1996) "Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization, " Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library, " J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis, " J. Immunol. Methods 296:95-101). Preferiblemente, el "botón" se modifica en los dominios CH2-CH3 de la primera cadena polipeptídica y el "agujero" se modifica en los dominios CH2-CH3 de la tercera cadena polipeptídica de diacuerpos que comprenden tres cadenas polipeptídicas. Por tanto, el "botón" ayudará a evitar que la primera cadena polipeptídica se homodimerice a través de sus dominios CH2 y/o CH3. Como la tercera cadena polipeptídica contiene preferiblemente la sustitución del "agujero", se heterodimerizará con la primera cadena polipeptídica y se homodimerizará consigo misma. Esta estrategia puede utilizarse para diacuerpos y moléculas de unión trivalentes que comprenden tres, cuatro o cinco cadenas como se ha detallado anteriormente, donde el "botón" se modifica en los dominios CH2-CH3 de la primera cadena polipeptídica y el "agujero" se modifica en los dominios CH2-CH3 de la tercera cadena polipeptídica.

50 55 60 65 Un botón preferido se crea modificando una región Fc de IgG para que contenga la modificación T366W. Un agujero preferido se crea modificando una región Fc de IgG para que contenga la modificación T366S, L368A e Y407V. Para ayudar a purificar el homodímero de la tercera cadena polipeptídica que lleva agujeros de la molécula que contiene la Región Fc heterodimérica biespecífica final, el sitio de unión de la proteína A de los dominios CH2 y CH3 que llevan agujeros de la tercera cadena polipeptídica se muta preferiblemente mediante sustitución de aminoácidos en la posición 435 (H435R). Por tanto, el homodímero de la tercera cadena polipeptídica que lleva agujeros no se unirá a la proteína A, mientras que el heterodímero biespecífico conservará su capacidad para unirse a la proteína A a través del sitio de unión de la proteína A en la primera cadena polipeptídica. En una realización alternativa, la tercera cadena polipeptídica que lleva agujeros puede incorporar sustituciones de aminoácidos en las posiciones 434 y 435 (N434A/N435K).

Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para los dominios CH2 y CH3 de la primera cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc de la presente divulgación puede tener la secuencia "portadora de botones" (**SEQ ID NO: 6**):

5 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQOPENN YKTPPVLDs DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

10 en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para los dominios CH2 y CH3 de la segunda cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc que tiene dos cadenas polipeptídicas (o la tercera cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc que tiene tres, cuatro, o cinco cadenas polipeptídicas) tendrán la secuencia "**que lleva agujeros**" (**SEQ ID NO: 7**):

20 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQOPENN YKTPPVLDs DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNRYTQKS LSLSPGX

25 en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

Como se observará, los dominios CH2-CH3 de la **SEQ ID NO: 6** y la **SEQ ID NO: 7** incluyen una sustitución en la posición 234 con alanina y 235 con alanina, y por tanto forman una región Fc que muestra unión disminuida (o sustancialmente nula) a Fc<sub>Y</sub>RI (CD64), Fc<sub>Y</sub>RIIA (CD32A), Fc<sub>Y</sub>RIIB (CD32B), Fc<sub>Y</sub>RIIA (CD16a) o Fc<sub>Y</sub>RIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 1**). Los dominios CH2-CH3 pueden comprender sustituciones alternativas y/o adicionales que modifican la función efectora y/o la actividad de unión a Fc<sub>Y</sub>RI de la región Fc. Los dominios CH2-CH3 pueden comprender además una o más sustituciones de aminoácidos que prolongan la vida media. Tales dominios CH2-CH3 con agujeros y con botones que además comprenden M252Y/S254T/T256E.

35 Se prefiere que la primera cadena polipeptídica tenga una secuencia CH2-CH3 "que lleve botones", tal como la de la **SEQ ID NO: 6**. Sin embargo, como se reconocerá, podría emplearse un dominio CH2-CH3 "que lleva botones" (por ejemplo, **SEQ ID NO: 7**) en la primera cadena polipeptídica, en cuyo caso, un dominio CH2-CH3 "que lleva botones". (por ejemplo, **SEQ ID NO: 6**) se emplearía en la segunda cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc de la presente invención que tiene dos cadenas polipeptídicas (o en la tercera cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc que tiene tres, cuatro o cinco cadenas polipeptídicas).

40 Moléculas que contienen la región Fc (por ejemplo, anticuerpos y diacuerpos que contienen la región Fc) que tienen dominios CH2 y CH3 de tipo salvaje, o que tienen dominios CH2 y CH3 que pueden comprender combinaciones de las sustituciones descritas anteriormente. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de un dominio CH2-CH3 de IgG1 que abarca tales variaciones es (**SEQ ID NO: 260**):

45 APEX<sub>1</sub>X<sub>2</sub>GGPSV FLFPPKPKDT LX<sub>3</sub>IX<sub>4</sub>RX<sub>5</sub>PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLX<sub>6</sub>CX<sub>7</sub>VK GFYPSDIAVE  
 WESNGQOPENN YKTPPVLDs DGSFFLX<sub>8</sub>SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHX<sub>9</sub>X<sub>10</sub>YTQKS LSLSPG<sub>X11</sub>

55 en donde:

- (a) X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son ambos L (tipo salvaje), o ambos son A (unión disminuida de Fc<sub>Y</sub>RI);
- (b) X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> respectivamente son M, S y T (tipo salvaje), o son Y, T y E (vida media extendida);
- (c) X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> y X<sub>8</sub> respectivamente son: T, L e Y (tipo salvaje), o son W, L e Y (botón), o S, A y V (agujero);
- (d) X<sub>9</sub> y X<sub>10</sub>, respectivamente, son N y H (tipo salvaje), o son N y R (sin unión a proteína A), o A y K (sin unión a proteína A); y
- (e) X<sub>11</sub> es K o está ausente.

60 65 Moléculas de unión a PD-1 que pueden comprender dominios CH2 y/o CH3 que se han modificado para

favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización usando mutaciones conocidas en la técnica, tales como las divulgadas en la Publicación de PCT Nº WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867.

5 **VIII. Moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3**

Son divulgadas, pero no reivindicadas moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos biespecíficos, etc..) que comprenden un fragmento de unión a epítopo de un anticuerpo anti-PD-1, y preferiblemente uno de los nuevos anticuerpos anti-PD-1 humana proporcionados en la presente, y un fragmento de unión a epítopo de un anticuerpo anti-LAG-3 humano, preferiblemente uno de los nuevos anticuerpos anti-LAG-3 humano proporcionados en la presente. Las moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 preferidas de la presente divulgación poseen fragmentos de anticuerpos de unión a epítopo que les permiten unirse coordinadamente a dos epítopos diferentes: un epítopo de PD-1 y un epítopo de LAG-3., para atenuar las actividades inhibidoras de tales moléculas. Como se usa en la presente, tal atenuación se refiere a una disminución de por lo menos el 20%, una disminución de por lo menos el 50%, una disminución de por lo menos el 80% o una disminución de por lo menos el 90% en la actividad inhibidora detectable PD-1 y/o LAG-3, o la eliminación completa de la actividad inhibidora detectable de PD-1 y/o LAG-3. La selección de los fragmentos de unión al epítopo (por ejemplo, dominios VL y VH) del anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-LAG-3 se coordina de tal manera que las cadenas polipeptídicas que componen tales moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 se ensamblan para formar por lo menos un sitio de unión al antígeno funcional que es específico para el primer antígeno (es decir, PD-1 o LAG-3) y por lo menos un sitio de unión al antígeno funcional que es específico para el segundo antígeno (es decir, PD-1 o LAG-3, dependiendo de la identidad del primer antígeno).

En un caso particular, una molécula de unión biespecífica de PD-1 x LAG-3 es un diacuerpo biespecífico, que preferiblemente comprende dos, tres, cuatro o cinco cadenas polipeptídicas como se describe en la presente. En otro caso particular, una molécula de unión biespecífica de PD-1 x LAG-3 de la presente divulgación es un anticuerpo biespecífico, que preferiblemente comprende dos, tres o cuatro cadenas polipeptídicas como se describe en la presente (ver también, por ejemplo, WO 2007/024715; WO2007/110205; WO 2009/080251; WO 2009/080254; WO 2009/089004; WO 2011/069104; WO 2011/117329; WO 2011/131746; WO 2011/133886; WO 2011/143545; WO 2012/023053; WO 2013/060867).

**A. Anticuerpos de LAG-3 antihumanos**

Son divulgados, pero no reivindicados anticuerpos que son inmunoespecíficos para LAG-3 humano. Pueden prepararse anticuerpos adicionales deseados aislando hibridomas secretores de anticuerpos provocados usando LAG-3 o un fragmento peptídico del mismo, o seleccionando bibliotecas de anticuerpos recombinantes para la unión a LAG-3 o un fragmento peptídico del mismo. El LAG-3 humano (que incluye una secuencia señal de 28 residuos de aminoácidos (que se muestra subrayada) y la proteína madura de 497 residuos de aminoácidos) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 38**):

40 **MWEAQFLGLL** **FLQPLWVAPV** **KPLQPGAE**VP VVWAQEGAPA QLPCSPTIPL  
QDLSSLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT  
45 VLSVGPGLLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA  
VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV  
HWFRNRGQGR VPVRESPHHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN  
50 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP  
PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLQEQ QLNATVTLAI  
ITVTPKSFGS PGSLGKLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA  
55 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL  
LLFLILGVLS LLLLVTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE  
ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

60 **1. LAG-3 mAb A**

Se han descrito el anticuerpo anti-LAG-3 humano BMS-986016 (25F7; Medarex/BMS), designado en la presente como "**LAG-3 mAb A**", y variantes del mismo (ver, por ejemplo, la WO 2014/008218). La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del **LAG-3 mAb A** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 39**) (las CDR se muestran subrayadas):

5 QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGFS DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE  
INHNGNTNSN PSLKSRVTLS LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS  
DYEYNWFDPW GQGTLTVSS

10 La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del **LAG-3 mAb A** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 40**) (las CDR se muestran subrayadas):

10 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQ RSNWPLTFGQ  
15 GTNLEIK

15 Recientemente se han identificado anticuerpos anti-LAG-3 humanos murinos adicionales que poseen características de unión únicas (ver, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 62/172.277). Las moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 preferidas comprenden los fragmentos de unión a epítopo del anticuerpo anti-LAG-3 humano **LAG-3 mAb 1** o **LAG-3 mAb 6**, anticuerpos, que se unen a un nuevo epítopo y no compita con BMS-986016 por la unión de LAG-3. Se prefieren particularmente, las moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 que poseen dominios VH y/o VL humanizados de LAG-3 mAb 1 o LAG-3 mAb 6.

## 2. LAG-1 mAb 1

25 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO: 41**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

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

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

40 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO: 45**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

40 DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE  
45 RLIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHFP  
YTFGGGTKKLE IK

45 CDR<sub>L1</sub> de LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO: 46**): KSSQSLLHSDGKTYLN  
CDR<sub>L2</sub> de LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO: 47**): LVSELDS  
CDR<sub>L3</sub> de LAG-3 mAb 1 (**SEQ ID NO: 48**): WQGTHFPYT

50 A continuación se proporcionan dos dominios VH humanizados ejemplares de LAG-3 mAb 1 designados en la presente como "**hLAG-3 mAb 1 VH1**" y "**hLAG-3 mAb 1 VH2**" y cuatro dominios VL humanizados ejemplares de LAG-3 mAb 1 "**hLAG-3 mAb 1 VL1**," "**hLAG-3 mAb 1 VL2**," "**hLAG-3 mAb 1 VL3**," y "**hLAG-3 mAb 1 VL4**". Cualquier de los dominios VL humanizados puede emparejarse con cualquiera de los dominios VH humanizados para generar un dominio de unión a LAG-3. Por consiguiente, a cualquier anticuerpo que comprenda uno de los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se hace referencia genéricamente como "**hLAG-3 mAb 1**" y a las combinaciones particulares de dominios VH/VL humanizados se hace referencia como los dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hLAG-3 mAb 1 VH1 y hLAG-3 mAb 1 VL2 se hace referencia específicamente como "**hLAG-3 mAb 1 (1.2)**".

60 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de **hLAG-3 mAb 1 VH1** (**SEQ ID NO: 49**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

60 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
65 INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARE  
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

5 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de **hLAG-3 mAb 1 VH2 (SEQ ID NO: 50)** (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

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

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 1 VL1 (SEQ ID NO: 51)** (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

20 DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IK

25 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 1 VL2 (SEQ ID NO: 52)** (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

30 DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPGQSPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IK

35 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 1 VL3 (SEQ ID NO: 53)** (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

40 DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IK

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 1 VL4 (SEQ ID NO: 54)** (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

50 DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IK

55 La CDR<sub>L</sub>1 del dominio VL de hLAG-3 mAb 1 VL4 comprende una sustitución de aminoácidos de glicina por alanina y tiene la secuencia de aminoácidos: **KSSQSLLHSD A KTYLN (SEQ ID NO: 55)**, la alanina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios CDR<sub>L</sub>1 de LAG-3 mAb 1 descritos anteriormente.

### 3. LAG-3 mAb 6

60 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 56) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

65 EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD  
INPDNGVTIY NQKFEKGATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAREA  
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

5 CDR<sub>H</sub>1 de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 57**): DYNMD  
 CDR<sub>H</sub>2 de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 58**): DINPDNGVTIYNQKFEG  
 CDR<sub>H</sub>3 de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 59**): EADYFYFDY

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 60**) (los residuos de CDR se muestran subrayados):

10 DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS SVVAWYQQKP GQSPKLLIS  
ASYRYTGVPD RFTGSGSGTD FFTTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG  
 GTKLEIK

15 CDR<sub>L</sub>1 de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 61**): KASQDVSSWA  
 CDR<sub>L</sub>2 de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 62**): SASYRYT  
 CDR<sub>L</sub>3 de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 63**): HYSTPWT

20 A continuación se proporcionan dos dominios VH humanizados ejemplares de LAG-3 mAb 6 designados en la presente como "**hLAG-3 mAb 6 VH1**" y "**hLAG-3 mAb 6 VH2**" y dos dominios VL humanizados ejemplares de LAG-3 mAb 6 "**hLAG-3 mAb 1 VL1**" y "**hLAG-3 mAb 1 VL2**". Cualquiera de los dominios VL humanizados puede emparejarse con cualquiera de los dominios VH humanizados para generar un dominio de unión a LAG-3. Por consiguiente, a cualquier anticuerpo que comprenda uno de los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se hace referencia genéricamente como "**hLAG-3 mAb 6**", y a las combinaciones particulares de dominios VH/VL humanizados se hace referencia como los dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hLAG-3 mAb 6 VH1 y hLAG-3 mAb 6 VL2 se hace referencia específicamente como "**hLAG-3 mAb 6 (1.2)**".

30 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de **hLAG-3 mAb 6 VH1** (**SEQ ID NO: 294**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

35 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMG  
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDTSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARE  
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

40 A continuación se muestra una secuencia de aminoácidos del dominio VH de **hLAG-3 mAb 6 VH2** (**SEQ ID NO: 295**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

45 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGKGLEWVSD  
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARE  
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

50 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 6 VL1** (**SEQ ID NO: 296**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

55 DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIS  
ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG  
 GTKLEIK

60 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 6 VL2** (**SEQ ID NO: 297**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

65 DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIS  
ASYRYTGVPD RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG  
 GTKLEIK

65 La CDR<sub>L</sub>1 del dominio VL de hLAG-3 mAb 6 VL1 y VL2 comprende una sustitución de aminoácidos de

lisina por arginina y tiene la secuencia de aminoácidos: **RASQDVSSWA (SEQ ID NO: 298)**, la arginina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios CDR<sub>L1</sub> de LAG-3 mAb 6 descritos anteriormente.

5      **B. Diacuerpos que contienen la región Fc de cuatro cadenas ejemplares y que tienen espirales E/K**

10     Son divulgados, pero no reivindicados cuatro diacuerpos que contienen Región Fc de cuatro cadenas biespecíficos PD-1 X LAG-3 ejemplares que comprenden dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K (designados "**DART A**", "**DART B**", "**DART C**" y "**DART I**"), que fueran generados. La estructura de estos diacuerpos que contienen la región Fc se detalla a continuación.

15     **1. DART A**

20     DART A es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, una región Fc de IgG4 variante modificada para una vida media ampliada y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K que contienen cisteína. La primera y tercera cadenas polipeptídicas de DART A comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 23**)); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); un dominio CH2-CH3 de IgG4 variante que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

25     La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART A es una variante de la **SEQ ID NO: 267**:

30     DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDX<sub>1</sub>KTYLNW LLQKPGQPPE  
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKPGASVKV SCKASGYSFT  
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
35     MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAC  
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP  
KPKDTLX<sub>2</sub>IX<sub>3</sub>R X<sub>4</sub>PEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ  
40     FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQP  
PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP  
PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSL  
45     G

en donde X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> y X<sub>4</sub> se seleccionan independientemente, y donde X<sub>1</sub> es A o G; X<sub>2</sub> es Y o M; X<sub>3</sub> es T o S; y X<sub>4</sub> es E o T.

50     Las secuencias de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART A es la **SEQ ID NO: 267**, en donde X<sub>1</sub> es A; X<sub>2</sub> es Y; X<sub>3</sub> es T; y X<sub>4</sub> es E.

55     La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART A comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 24**)) y un extremo C-terminal.

60     La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART A es (**SEQ ID NO: 268**):

65     EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSPRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN  
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL  
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAC  
KEKVAALKEK VAIKEKVAAC IKE

## 2. DART B

10 DART B es idéntico a DART A, excepto que la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART B comprenden el dominio VL de hLAG-3 mAb 1 VL3 (SEQ ID NO: 53), que comprende una sustitución de aminoácidos en CDR<sub>L1</sub>. Por tanto, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART B comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL3) (**SEQ ID NO: 53**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 23**)); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); una variante del dominio CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

25 La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas polipeptídicas de DART B es la **SEQ ID NO: 267**, en donde X<sub>1</sub> es G; X<sub>2</sub> es Y; X<sub>3</sub> es T; y X<sub>4</sub> es E.

25 La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART B es la **SEQ ID NO: 268**.

## 3. DART C

30 DART C es idéntico a DART B, excepto que la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART B comprenden un dominio CH2-CH3 de IgG4 de tipo salvaje que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 4**). Por tanto, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART C comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL3) (**SEQ ID NO: 53**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 23**)); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); un dominio CH2-CH3 de IgG4 que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 4**); y un extremo C-terminal.

40 La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART C es la **SEQ ID NO: 267**, en donde X<sub>1</sub> es G; X<sub>2</sub> es M; X<sub>3</sub> es S; y X<sub>4</sub> es T.

45 La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART C es la **SEQ ID NO: 268**.

## 4. DART I

50 DART I es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, una región Fc de IgG4 variante diseñada para una vida media extendida y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K que contienen cisteína. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART I comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 6 VL1) (**SEQ ID NO: 296**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 23**)); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); un dominio CH2-CH3 de IgG4 variante que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

60 La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART I es (**SEQ ID NO: 290**):

5 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
 ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG  
 10 GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN  
 WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS  
 LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTIV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA  
 15 ALEKEVAALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT  
 LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNNAKTK PREEQFNSTY  
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT  
 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPPVLD  
 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

20 La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART I comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 6 VH1) (**SEQ ID NO: 294**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 24**) y un extremo C-terminal.

25 La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART I es (**SEQ ID NO: 291**):

30 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GPVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 35 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD  
 YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM  
 ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSGGC GGGKVAACKE  
 KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

#### C. Diacuerpos que contienen la región Fc de cuatro cadenas ejemplares que tienen dominios CL/CH1

40 Son divulgados, pero no reivindicados cuatro diacuerpos que contienen región Fc de cuatro cadenas biespecíficos de PD-1 X LAG-3 que comprenden dominios CL/CH1 designados "DART D", "DART E", "DART J" y "DART 1", que fueran generados. La estructura de estos diacuerpos que contienen la región Fc se detalla a continuación.

##### 45 1. DART D

50 DART D es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1 y una región Fc de IgG4 variante modificada para una vida media prolongada. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART D comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); una variante de un dominio CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

60 La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART D es (**SEQ ID NO: 269**):

65 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GPVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN

5 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDT SASTAYL  
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMGYWG QGTTTVVSSL GGGSGASTKG  
 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PTVSWNSGA LTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP  
 10 CPPCPAPEFL GGPSVLFPP KPKDLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF  
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN  
 KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC  
 15 SVMHEALHNN YTQKSLSLSL G

15 La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART D comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio (**Conector 2**: LGGGSG (**SEQ ID NO: 261**)); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**); y un extremo C-terminal.

20 La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART D es (**SEQ ID NO: 270**):

25 DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 30 YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLTVVSSL GGGSGRTVAA  
 35 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES  
 VTEQDSKDST YSLSSTLTL KADYEHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRC  
 EC

## 2. DART E

40 DART E es otro diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1 y una región Fc de IgG4 variante diseñada para una vida media prolongada. La posición de los sitios de unión de PD-1 y LAG-3 de DART E se invierte en comparación con DART D.

45 La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART E comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio (**Conector 2**: LGGGSG (**SEQ ID NO: 261**)); un dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); una variante de un dominio CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

55 La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas polipeptídicas de DART E es (**SEQ ID NO: 271**):

60

65

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 5 YTFGGGTKE IKGGGGGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGASTKG  
 10 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDVFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSL SSVTVPPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP  
 CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF  
 15 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN  
 KGLPSSIEKT ISKAKGQPREG PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC  
 20 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

20 La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART E comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGGGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**) y un extremo C-terminal.

25 La secuencia de aminoácidos de la segunda y cuarta cadenas polipeptídicas de DART E es (**SEQ ID NO: 272**):  
 30

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 35 TFGGGTKEI KGGGGGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN  
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL  
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMWDYWG QGTTVTVSSL GGGSGRTVAA  
 40 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES  
 VTEQDSKDST YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRC  
 EC

### 3. DART J

45 DART J es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1 y una región Fc de IgG4 variante diseñada para una vida media prolongada. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART J comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 6 VL1) (**SEQ ID NO: 296**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGGGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); una variante de un dominio CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

55 La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART J es (**SEQ ID NO: 292**):  
 60

5 DIQMTQSPSS LSASVGDRV T ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS  
 ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFFG  
 GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN  
 WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVITVDKS TSTAYMELSS  
 LRSEDTAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTIV TVSSLGGGSG ASTKGPSVFP  
 10 LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVT VPSSSLGKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPCP  
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
 15 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTPPPVLDs DGSFFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
 20 ALHNHYTQKS LSLSLG

20 La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART J comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 6 VH1) (**SEQ ID NO: 294**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**); y un extremo C-terminal.

25 La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART J es (**SEQ ID NO: 293**):  
 30

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 35 TFGGGTKVEI KGGGSGGGG VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFD  
 YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM  
 ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSLGG GSGRTVAAPS  
 40 VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT  
 EQDSKDSTYS LSSTLTLASKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

#### 4. DART 1

45 DART 1 es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1 y una región Fc de IgG1 variante diseñada para reducir la unión de FcYR. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART 1 comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> PD-1 mAb A VL) (**SEQ ID NO: 65**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> LAG-3 mAb A VH1) (**SEQ ID NO: 39**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); una variante de un dominio CH2-CH3 de IgG1 que comprende las sustituciones L234A/L235A y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 5**); y un extremo C-terminal.

55 La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART 1 es (**SEQ ID NO: 284**):  
 60

5 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
 ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ  
 GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVVQPG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH  
 WVRQAPGKGL EWVAVIWYDG SKRYYADSVK GRFTISRDNS KNTLFLQMNS  
 LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLTVSSLG GGSGASTKGP SVFPLAPSSK  
 10 STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSL  
 SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPPCPAPE  
 AAGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE  
 15 VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE  
 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES  
 NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH  
 NHYTQKSLSL SPG

20 La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART 1 comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> LAG-3 mAb A VL) (**SEQ ID NO: 40**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGGGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> PD-1 mAb A VH) (**SEQ ID NO: 64**); un péptido conector intermedio (**Conector 2**: LGGSGG (**SEQ ID NO: 261**)); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**); y un extremo C-terminal.

25 La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART 1 es (**SEQ ID NO: 285**):

30 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
 ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ  
 35 GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLSLTCAVY GGSFSDYYWN  
 WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNPSLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRSV  
 TAADTAVYYC AFGYSDYEYN WFDPWGQGTL VTVSSLGGGS GRTVAAPSVF  
 40 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ  
 DSKDSTYSLS STTLSKADY EHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

#### D. Diacuerpos que contienen la región Fc de cinco cadenas ejemplares

45 Son divulgados, pero no reivindicados dos diacuerpos que contienen la región Fc de cinco cadenas biespecífico PD-1 X LAG-3 ejemplares, que comprenden dominios CL/CH1 y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K designados "**DART F**" y "**DART G**", que fueran generados. La estructura de estos diacuerpos que contienen la región Fc se detalla a continuación.

##### 50 1. DART F

DART F es un diacuerpo que contiene la región de cinco cadenas Fc biespecífico y que tiene tres sitios de unión específicos para PD-1, un sitio de unión específico para LAG-3, los dominios CL/CH1, una región Fc de IgG1 que lleva botón/agujero variante modificada para la unión de FcγR reducida y la vida media prolongada, y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K. La primera cadena polipeptídica de DART F comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 con agujeros que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 260**, donde X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es A; X<sub>3</sub> es Y, X<sub>4</sub> es T, X<sub>5</sub> es E, X<sub>6</sub> es S, X<sub>7</sub> es A, X<sub>8</sub> es V, X<sub>9</sub> es A, X<sub>10</sub> es K y X<sub>11</sub> está ausente); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de DART F es (**SEQ ID NO: 273**):

5 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
 10 IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
 15 YGTSPFAYWG QGTLTVVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
 TYFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTW PSSSLGTQTY  
 20 ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
 DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
 25 YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVLL  
 DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHAKYTQ KSLSLSPG

15 La segunda y la quinta cadenas polipeptídicas de DART F comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**), un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**), y un extremo C-terminal.

20 La secuencia de aminoácidos de la segunda y la quinta cadena polipeptídica de DART F es (**SEQ ID NO: 274**):

25 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 30 LIHAASNQGS GVPSPFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
 QWKVDNALQSQNS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STTLSKADY EHKVYACEV  
 35 THQGLSSPVTKSFNRGEC

35 La tercera cadena polipeptídica de DART F comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 que lleva un botón que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 260**, en donde X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es A; X<sub>3</sub> es Y, X<sub>4</sub> es T, X<sub>5</sub> es E, X<sub>6</sub> es W, X<sub>7</sub> es L, X<sub>8</sub> es Y, X<sub>9</sub> es N, X<sub>10</sub> es H y X<sub>11</sub> está ausente); un péptido conector intermedio (GGGSGGGGGGGG (**SEQ ID NO: 262**)); un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2**: GGCAGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 21**)); y un extremo C-terminal.

40 La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica de DART F es (**SEQ ID NO: 275**):

45

50

55

60

65

QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYSFT	SYWMNWVRQA	PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL	DQKFKDRVTI	TVDKSTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG	QGTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW	NSGALTSGVH	TFPAVLQSSG	LYSLSVVTV	PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN	TKVDKRVEPK	SCDKTHTCPP	CPAPEAAGGP	SVFLFPPKPK
DTLYITREPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV
YTLPPSREEM	TKNQVSLWCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTPPPVLL
DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGGG
GSGGGSGGGD	IVMTQTPLSL	SVTPGQPASI	SCKSSQSLLH	SDAKTYLNWL
LQKPGQPPER	LIYLVSELDs	GVPDRFSGSG	SGTDFTLKIS	RVEAEVGVY
YCWQGTHFPY	TFGGGTKVEI	KGGGSGGGQ	VQLVQSGAEV	KKPGASVKVS
CKASGYSFTS	YWMNWVRQAP	GQGLEWIGVI	HPSDSETWLD	QFKDRVTIT
VDKSTSTAYM	ELSSLRSEDT	AVYYCAREHY	GTSPFAYWGQ	GTLVTVSSGG
CGGGEVAALE	KEVAALEKEV	AALEKEVAAL	EK	

La cuarta cadena polipeptídica de DART F comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímero (espiral K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 22**)); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de las cuartas cadenas polipeptídicas de DART F es (SEQ ID NO: 276):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKLI  
LIHAASNQGS GVPNSRFGSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFFGGGTKVEI KGGGGGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN  
YGMNWRVHQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTSASTAYL  
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMRDYWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL  
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

45 2. DART G

50 DART G es un diacuerpo que contiene la región Fc de cinco cadenas biespecífico y que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1, una variante de la región Fc de IgG1 con botón/agujero modificada para la unión de FcγR reducida y vida media prolongada, y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K. La primera cadena polipeptídica de DART G comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 con agujeros que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 260**, donde X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es A; X<sub>3</sub> es Y, X<sub>4</sub> es T, X<sub>5</sub> es E, X<sub>6</sub> es S, X<sub>7</sub> es A, X<sub>8</sub> es V, X<sub>9</sub> es A, X<sub>10</sub> es K y X<sub>11</sub> está ausente); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de DART G es (SEQ ID NO: 277):

5 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW  
 INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES  
 LYDYYSMFYW GQGTTTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK  
 10 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT  
 YICNVNWKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP  
 KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN  
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTI KAKGQPREPQ  
 15 VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPPV  
 LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHAKYT QKSLSLSPG

15 La segunda y la quinta cadenas polipeptídicas de DART G comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**), un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**), y un extremo C-terminal.

20 La secuencia de aminoácidos de la segunda y la quinta cadena polipeptídica de DART G es (**SEQ ID NO: 278**):

25 DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
 30 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTL SKAD YEKHKVYACE  
 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

35 La tercera cadena polipeptídica de DART G comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 que lleva un botón que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 260**, donde X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es A; X<sub>3</sub> es Y, X<sub>4</sub> es T, X<sub>5</sub> es E, X<sub>6</sub> es W, X<sub>7</sub> es L, X<sub>8</sub> es Y, X<sub>9</sub> es N, X<sub>10</sub> es H y X<sub>11</sub> está ausente); un péptido conector intermedio (GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO: 262**)); un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 21**)); y un extremo C-terminal.

40 45 La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica de DART G es (**SEQ ID NO: 279**):

50

55

60

65

QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	NYGMNWRQQA	PGQGLEWMGW
INTYTGESTY	ADDFEGRFVF	SMDTSASTAY	LQISSLKAED	TAVYYCARES
LYDYYSMDYW	GQGTTTVTVSS	ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT
YICNVNHKPS	NTKVDKRVEP	KSCDKTHTCP	PCPAPEAAGG	PSVFLFPPKP
KDTLYITREP	EVTCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTI	KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE	MTKNQVSLWC	LVKGFYPSDI	AVEWESENQQP	ENNYKTPPPV
LDSDGSFFLY	SKLTVDKSRW	QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGG
GGSGGGSGGG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASESVD	NYGMSFMNWF
QQKPGQPPKL	LIHAASNQGS	GVPSRFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFAVY
FCQQSKEVPY	TFGGGTKVEI	KGGGSGGGGQ	VQLVQSGAEV	KKPGASVKVS
CKASGYSFTS	YWMNWRVRQAP	GQGLEWIGVI	HPSDSETWLD	QKFKDRVTIT
VDKSTSTAYM	ELSSLRSEDT	AVYYCAREHY	GTSPFAYWGQ	GTLVTVSSGG
CGGGGEVAALE	KEVAALEKEV	AALEKEVAAL	EK	

La cuarta cadena polipeptídica de DART G comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros (espiral K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 22**) y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de las cuartas cadenas polipeptídicas de DART G es (SEQ ID NO: 280):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKLI  
LIHAASNQGS GVPSRFGSGSG SGTDFLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFFGGTKVEI KGGGSGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS  
YWMNWRVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVТИ VDKSTSTAYM  
ELSSLRSEDT AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAALK  
EKVAALKEKV AAIKEKVAALKE

45 E. Diacuerpo que contiene la región Fc de tres cadenas exemplar y que tiene espirales E/K

Son divulgados, pero no reivindicados diacuerpos que contienen la Región Fc de tres cadenas biespecíficos de PD-1 X LAG-3, que comprenden dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K. Se generó un diacuerpo que contiene Región Fc de tres cadenas, biespecífico de PD-1 X LAG-3 ejemplar, que comprende dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K designado "**DART H**". La estructura de estos diacuerpos que contienen la región Fc se detalla a continuación.

55 DART H es un diacuerpo que contiene la región Fc de tres cadenas biespecífico que tiene un sitio de unión específico para PD-1, un sitio de unión específico para LAG-3, una región Fc de IgG1 variante con botón/agujero modificado para reducir la unión de FcγR, y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K.

La primera cadena polipeptídica de DART H comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 21**)); un conector intermedio (**Espaciador-Conector 3: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 263)**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 que lleva un botón que comprende las sustituciones L234AVL235A y que tiene el residuo de lisina C-terminal (**SEQ ID NO: 6**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de DART H es (**SEQ ID NO: 281**):

5 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSPRSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 10 TFGGGTKVEI KGGGSGGGG VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYFTN  
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASTAYL  
 15 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMYWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL  
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 20 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS  
 PGK

La segunda cadena polipeptídica de DART H comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 **VL4**) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGGGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros (espiral K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 22**)); y un extremo C-terminal.

30 La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica de DART H es (**SEQ ID NO: 282**):

35 DIVMTQTPLS LSVPQGPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 YTFGGGKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGKVAAL  
 40 KEKVAALKE VAALKEKVAA LKE

45 La tercera cadena polipeptídica de DART H comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; una región bisagra (DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO: 31**)); un dominio CH2-CH3 de IgG1 que lleva un agujero que comprende las sustituciones L234A/L235A y que tiene el residuo de lisina C-terminal (**SEQ ID NO: 7**); y un extremo C-terminal.

50 La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica de DART H es (**SEQ ID NO: 283**):

55 DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHE  
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK  
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPPVLDs DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

#### F. Anticuerpo biespecífico ejemplar

60 Es divulgado, pero no reivindicado un anticuerpo biespecífico de cuatro cadenas de PD-1 X LAG-3 ejemplar designado "**BSAB A**", que se ha generado. La estructura de este anticuerpo biespecífico se detalla a continuación.

65 BSAB A es un anticuerpo biespecífico que tiene un sitio de unión específico para PD-1, un sitio de unión específico para LAG-3, una región Fc de IgG1 variante diseñada para reducir la unión de Fc<sub>Y</sub>R y fomentar la formación de complejos entre los dos polipéptidos de cadena pesada diferentes (ver, por ejemplo, la WO 2011/143545).

5 La primera cadena polipeptídica de BSAB A comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 variante que comprende las sustituciones D221E/P228E (numeradas por el índice EU según Kabat y subrayadas en las **SEQ ID NO: 286**, a continuación); un dominio CH2-CH3 de IgG1 variante que comprende las sustituciones L234A/L235A/L368E (subrayadas en la **SEQ ID NO: 286**, a continuación) y que carece del residuo C-terminal; y un extremo C-terminal.

10 La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de BSAB A es (**SEQ ID NO: 286**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWRQQA PGQGLEWIGV  
 IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
 YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY  
 ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCEKTHTCPE CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAAK TKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
 YTLPPSREEM TKNQVSLTCE VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV  
 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

25 La segunda cadena polipeptídica de BSAB comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**) y un extremo C-terminal.

30 La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica de BSAB es (**SEQ ID NO: 287**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSPFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KRTVAAPSVE IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYYPREAKV  
 QWKVDNALQG GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EKHKVYACEV  
 THQGLSSPVT KS FNRGEC

40 La tercera cadena polipeptídica de BSAB A comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 variante que comprende las sustituciones D221R/P228R (subrayadas en la **SEQ ID NO: 288**, a continuación); un dominio CH2-CH3 de IgG1 variante que comprende las sustituciones L234A/L235A/L409R (subrayadas en la **SEQ ID NO: 288**, a continuación) y que carece del residuo C-terminal; y un extremo C-terminal.

45 La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica de BSAB A es (**SEQ ID NO: 288**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWRQQA PGQGLEWMGW  
 INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES  
 LYDYYSMWDW GQGTTTVVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK  
 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVTV VPSSSLGTQT  
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCRKTHTCP RCPAPEAAGGP PSVFLFPPKPK  
 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNAAK TKPREEQYNS  
 STYRVVSVLTV LHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ  
 VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQPE ENNYKTTPPV  
 LDSDGFFLYS SRLTVDKSRW Q QGNVFSCSVM MHEALHNHYT QKSLSLSPG

65 La cuarta cadena polipeptídica de BSAB A comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo

N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL<sub>LAG-3</sub> hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**) y un extremo C-terminal.

5 La secuencia de aminoácidos de la cuarta cadena polipeptídica de BSAB A es (**SEQ ID NO: 289**):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE  
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP  
 10 YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEHKVYACE  
 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

15 **IX. Anticuerpos de referencia**

**A. Anticuerpos anti-PD-1 humana de referencia**

20 Para evaluar y caracterizar las nuevas moléculas de unión a anti-PD-1 humana divulgadas en este documento, se emplearon los siguientes anticuerpos de referencia: nivolumab (también conocido como 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106, y comercializado como OPDIVO® por Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo de IgG4 humano designado en la presente como "**PD-1mAb A**"; y pembrolizumab (anteriormente conocido como lambrolizumab, también conocido como MK-3475, SCH-900475, y comercializado como KEYTRUDA® por Merck) un anticuerpo de IgG4 humanizado designado en la presente como

25 "**PD-1 mAb B.**"

**1. Nivolumab ("PD-1 mAb A")**

30 La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de **PD-1 mAb A** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 64**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

QVQLVESGGG VVQPGRLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV  
 35 IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND  
DYWGQGTLVT VSS

40 La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del **PD-1 mAb A** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 65**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
 45 ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ  
 GTKVEIK

**2. Pembrolizumab ("PD-1 mAb B")**

50 La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del **PD-1 mAb B** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 66**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados):

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG  
 55 INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD  
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

55 La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del **PD-1 mAb B** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 67**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL  
 60 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSDRLPL  
TFGGGTKVEIK

**X. Métodos de producción**

65

5 Pueden crearse un polipéptido anti-PD-1 humana y otros agonistas, antagonistas y moduladores de PD-1 a partir de los polinucleótidos y/o secuencias de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, sintética o recombinantemente. Un método para producir tales agonistas, antagonistas y moduladores de péptidos implica la síntesis química del polipéptido, seguido de tratamiento en condiciones oxidantes apropiadas para obtener la conformación nativa, es decir, los enlaces de enlace disulfuro correctos. Esto puede lograrse usando metodologías bien conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Kelley, R. F. et al. (1990) In: *GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS*, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M et al. (1984) *SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; ver también las Patentes de Estados Unidos Nº 4.105.603; 3.972.859; 3.842.067; y 3.862.925).

10 10 Los polipéptidos de la divulgación pueden prepararse convenientemente usando síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," *Science* 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," *Mini Rev. Med. Chem.* 6(1):3-10).

20 15 En otra alternativa más, pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos que tienen una o más de las CDR de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15, o que compiten con PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, para la unión a PD-1 humana o una forma soluble de la misma mediante el uso de ratones disponibles comercialmente que han sido modificados para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. 25 También pueden usarse animales transgénicos que están diseñados para producir un producto más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o una respuesta inmunitaria más robusta para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de dicha tecnología son XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) y HUMAB- MOUSE® y TC MOUSE™ (ambos de Medarex, Inc., Princeton, NJ).

30 30 Como alternativa, los anticuerpos pueden elaborarse de manera recombinante y expresarse usando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos pueden elaborarse de manera recombinante aislando primero los anticuerpos elaborados a partir de animales huésped, obteniendo la secuencia del gen y usando la secuencia del gen para expresar el anticuerpo de manera recombinante en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro método que puede emplearse es expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito métodos adecuados para expresar anticuerpos de manera recombinante en plantas o leche (ver, por ejemplo, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; and Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," *J. Immunol. Methods* 231:147-157). En la técnica se conocen métodos adecuados para elaborar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc. En otra alternativa, los anticuerpos pueden elaborarse de manera recombinante mediante tecnología de presentación de fagos (ver, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 40 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; 6.265.150; y Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455).

45 45 Los anticuerpos o la proteína de interés pueden someterse a secuenciación mediante degradación de Edman, que es bien conocida por los expertos en la técnica. La información de péptidos generada a partir de espectrometría de masas o degradación de Edman puede usarse para diseñar sondas o cebadores que se usan para clonar la proteína de interés.

50 50 Un método alternativo de clonación de la proteína de interés es mediante "inmunoabsorción" usando PD-1 purificado o porciones del mismo para células que expresan un anticuerpo o proteína de interés que posee una o más de las CDR de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, o de un anticuerpo que compite con PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, para la unión a PD-1 humana. El procedimiento de "inmunoabsorción" puede realizar obteniendo una biblioteca de ADNc de tejidos o células que expresan PD-1, sobreexpresando los ADNc en un segundo tipo de célula, y seleccionando las células transfectadas del segundo tipo de célula para una unión específica a PD-1 en presencia o ausencia de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15. 55 60 EN la técnica pueden encontrarse descripciones detalladas de los métodos usados en la clonación de genes de mamíferos que codifican las proteínas de la superficie celular mediante "inmunoabsorción" (ver, por ejemplo, Aruffo, A. et al. (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 84:8573-8577 y Stephan, J. et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation," *Endocrinol.* 140:5841-5854).

5 Los vectores que contienen polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquiera de varios medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

10 Puede usarse cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos con el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitativos de células huésped de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células COS, HeLa y CHO. Preferiblemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel aproximadamente 5 veces más alto, más preferiblemente 10 veces más alto, incluso más preferiblemente 20 veces más alto que el del anticuerpo o proteína endógena de interés correspondientes, si están presente, en las células huésped. La selección de las células huésped para una unión 15 específica a PD-1 se efectúa mediante un immunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o la proteína de interés.

20 Los polipéptidos de esta invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden elaborarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse mediante degradación proteolítica o de otro tipo de los anticuerpos, mediante métodos recombinantes (es decir, polipéptidos únicos o de fusión) como se ha descrito anteriormente o mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se elaboran convenientemente mediante síntesis química. Los métodos de síntesis química son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un polipéptido anti-PD-1 humana podría producirse mediante un sintetizador de polipéptidos automatizado empleando el método de fase sólida.

25 Son divulgadas, pero no reivindicadas variantes de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15 y sus fragmentos polipeptídicos que se unen a PD-1, incluyendo anticuerpos 30 funcionalmente equivalentes y polipéptidos de fusión que no afectan significativamente a las propiedades de tales moléculas, así como variantes que tienen actividad mejorada o disminuida. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no es necesario describirla con detalle en la presente. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más 35 delecciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de manera perjudicial la actividad funcional, o el uso de análogos químicos. Los residuos de aminoácidos que pueden sustituirse de manera conservadora entre sí incluyen, pero no se limitan a: glicina/alanina; serina/treonina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina. Estos polipéptidos 40 también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos serían conservadoras, es decir, el aminoácido sustituido poseería 45 propiedades químicas similares a las del aminoácido original. Tales sustituciones conservadoras son conocidas en la técnica y se han proporcionado ejemplos con anterioridad. Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, como el dominio variable. Los cambios en el dominio variable pueden alterar la afinidad y/o especificidad de unión. Otros métodos de modificación 50 incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Pueden usarse modificaciones, por ejemplo, para la unión de marcadores para inmunoensayo, como la unión de fracciones radiactivas para radioinmunoensayo. Los polipéptidos modificados se elaboran usando procedimientos establecidos en la técnica y pueden seleccionarse usando ensayos 55 estándar conocidos en la técnica.

50 Son divulgadas, pero no reivindicadas proteínas de fusión que comprenden uno o más de los polipéptidos o anticuerpos PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15 de esta divulgación. En un caso, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende una cadena ligera, una cadena pesada o tanto una cadena ligera como una pesada. En otro caso, el polipéptido de fusión contiene una región 55 constante de inmunoglobulina heteróloga. En otro caso, el polipéptido de fusión contiene un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado públicamente. Para propósitos de esta divulgación, una proteína de fusión de un anticuerpo contiene uno o más dominios de polipéptidos que se unen específicamente a PD-1 y otra secuencia de aminoácidos a la que no se une en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región.

60 **XI. Usos de las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención**

**A. Usos terapéuticos**

65 Como se ha analizado anteriormente, PD-1 desempeña un papel importante en la regulación negativa de la

5 proliferación, función y homeostasis de las células T. Las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, tienen la capacidad de inhibir la función de PD-1 y, por tanto, revertir la inhibición del sistema inmunitario mediada por PD-1. Como tal, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 y PD-1 mAb 15, sus derivados humanizados y moléculas que comprenden sus fragmentos de unión a PD-1 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos biespecíficos (incluyendo, pero no limitados a, DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I y DART-J), etc.), o que compiten por la unión con tales anticuerpos, pueden usarse para bloquear la inhibición del sistema inmunitario mediada por PD-1 y, de ese modo, promover la activación del sistema inmunitario.

10 15 Moléculas de unión a PD-1 biespecíficas divulgadas, pero no reivindicadas en este documento, que se unen a PD-1 y a otra molécula implicada en la regulación de un punto de control inmune presente en la superficie celular (por ejemplo, LAG-3) aumentan el sistema inmunitario bloqueando la inhibición del sistema inmunitario mediada por PD-1 y tales moléculas de punto de control inmunológico. Por tanto, tales moléculas de unión a PD-1 son útiles para aumentar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la respuesta inmunitaria mediada por células T) de un sujeto. En particular, tales moléculas de unión a PD-1 pueden usarse para tratar cualquier enfermedad o afección 20 25 30 35 40 45 50 55 60 asociada con un sistema inmunitario indeseablemente suprimido, incluyendo el cáncer y las enfermedades que están asociadas con la presencia de un patógeno (por ejemplo, una bacteria, infección por hongos, virus o protozoos).

Los cánceres que pueden ser tratados por tales moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, incluyen cánceres caracterizados por la presencia de una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste de una célula de: un tumor de la glándula suprarrenal, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, tumores del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello uterino, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de células renales cromófobas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ossium de fibrogénesis imperfecta, una displasia fibrosa de hueso, un cáncer de vesícula biliar o de vías biliares, un cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina nerviosa periférica, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un rhabdomisarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejidos blandos, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides y un cáncer de útero.

En particular, tales moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden usarse en el tratamiento de cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de recto.

Las enfermedades asociadas a patógenos que pueden tratarse mediante tales moléculas de unión a PD-1 incluyen infecciones crónicas víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias. Las infecciones crónicas que pueden ser tratadas por las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación incluyen el virus de Epstein Barr, el virus de la hepatitis A (HAV); virus de la hepatitis B (VHB); virus de la hepatitis C (VHC); virus del herpes (por ejemplo, HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la estomatitis vesicular (VSV), *Bacilli*, *Citrobacter*, *Cholera*, *Diphtheria*, *Enterobacter*, *Gonococci*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Meningococci*, micobacteria, *Pseudomonas*, *Pneumonococci*, bacteria rickettsia, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Tetanus*, *Aspergillus* (fumigatus, niger, etc.), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, etc.), *Cryptococcus neoformans*, Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis*, *Borrelia burgdorferi*, helminth parasite (hookworm, tapeworms, flukes, flatworms (e.g. *Schistosomia*), *Giardia lamblia*, *trichinella*, *Dientamoeba Fragilis*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, y *Leishmania donovani*.

Moléculas de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden combinarse con otros agentes anticancerígenos, en particular, moléculas que se unen específicamente a un antígeno del cáncer (por ejemplo, anticuerpos, diacuerpos). Las terapias contra el cáncer que pueden combinarse con las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación incluyen moléculas que se unen

específicamente a uno más de los antígenos del cáncer incluyendo: **19.9** como se encuentra en el cáncer de colon, mucinas del cáncer gástrico; **4.2; A33** (un antígeno de carcinoma colorrectal; Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov; 33(8): 991-998); **ADAM-9** (Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2006/0172350; Publicación de PCT Nº WO 06/084075); **AH6** como se encuentra en cáncer gástrico; **ALCAM** (Publicación de PCT Nº WO 03/093443); **APO-1 (antígeno de linfocito humano maligno)** (Trauth et al. (1989) "Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis, " Science 245:301-304); **B1** (Egloff, A.M. et al. 2006, Cancer Res. 66(1):6-9); **B7-H3** (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", Genome Biol. 6:223.1-223.7). Chapoval, A. et al. (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN-γ Production", Nature Immunol. 2:269-274; Sun, M. et al. (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes", J. Immunol. 168:6294-6297); **10 BAGE** (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); **beta-catenina** (Prange W. et al. 2003 J Pathol. 21(2):250-9); **grupo sanguíneo ALe<sup>b</sup>/Le<sup>y</sup>** como se encuentra en el adenocarcinoma de colon; **antígeno de linfoma de Burkitt-38.13, C14** como se encuentra en el adenocarcinoma de colon; **CA125 (antígeno de carcinoma de ovario)** (Bast, R.C. Jr. et al. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Suppl 3:274-81 ; Yu et al. (1991) "Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants", Cancer Res. 51(2):468-475); **15 Carboxipeptidasa M** (Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2006/0166291); **CD5** (Calin, G.A. et al. 2006 Semin Oncol. 33(2):167-73; **CD19** (Ghetie et al. (1994) "Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest", Blood 83:1329-1336; Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); **CD20** (Reff et al. (1994) "Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20", Blood 83:435-445; Thomas, D.A. et al. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); **CD22** (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51); **CD23** (Rosati, S. et al. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5;294:91-107); **CD25** (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); **CD27** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD28** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD33** (Sgouros et al. (1993) "Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia, " J. Nucl. Med. 34:422-430); **CD36** (Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. et al. 2005 Ann NY Acad Sci. 1062:51-60); **CD45** (Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD46** (Patente de Estados Unidos Nº 7.148.038; Publicación de PCT Nº WO 03/032814); **CD52** (Eketorp, S.S. et al. (2014) "Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) As Single-Agent Therapy In Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL)-A Single Region Experience On Consecutive Patients", Ann Hematol. 93(10):1725-1733; Suresh, T. et al. (2014) "New Antibody Approaches To 20 Lymphoma Therapy", J. Hematol. Oncol. 7:58; Hoelzer, D. (2013) "Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia", Curr. Opin. Oncol. 25(6):701-706); **CD56** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD79a/CD79b** (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48; Chu, P.G. et al. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106); **CD103** (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); **CD317** (Kawai, S. et al. (2008) "Interferon-A Enhances CD317 Expression And The Antitumor Activity Of Anti-CD317 Monoclonal Antibody In Renal Cell Carcinoma Xenograft Models", Cancer Science 99(12):2461-2466; Wang, W. et al. (2009) HM1.24 (CD317) Is A Novel Target Against Lung Cancer For Immunotherapy Using Anti-HM1.24 Antibody", Cancer Immunology, Immunotherapy 58(6):967-976; Wang, W. et al. (2009) "Chimeric And Humanized Anti-HM1.24 Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against Lung Cancer Cells. Lung Cancer", 63(1):23-31; Sayeed, A. et al. (2013) "Aberrant Regulation Of The BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell 30 Proliferation And Apoptosis Evasion In High Grade Breast Cancer Cells", PLoS ONE 8(6)e67191, pp. 1-10); **CD4** (Lee, Y.M. et al. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); **CEA** (carcinoembryonic antigen; Foon et al. (1995) "Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotype Antibody Vaccine, " J. Clin. Invest. 96(1):334-42); Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. et al. 2005 Rev Invest. Clin. 57(6):814-9); **CEACAM9/CEACAM6** (Zheng, C. et al. (2011) "A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal 40 Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity", PLoS One 6(6):e21146, pp. 1-11); **CO17-1A** (Ragnhammar et al. (1993) "Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced, " Int. J. Cancer 53:751-758); **CO-43** (grupo sanguíneo Le<sup>b</sup>); **CO-514** (grupo sanguíneo Le<sup>a</sup>) como se encuentra en el adenocarcinoma; **CTA-1; CTLA-4** (Peggs, K.S. et al. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); **Citoqueratina 8** (Publicación de PCT Nº WO 03/024191); **D1.1; D156-22; DR5** (Abdulghani, J. et al. (2010) "TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics", Expert Opin. Ther. Targets 14(10): 1091-1108; Andera, L. (2009) "Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family", Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 153(3): 173-180; Carlo-Stella, C. et al. (2007) "Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy", Clin. Cancer 13(8):2313-2317; Chaudhari, B.R. et al. (2006) "Following the TRAIL to 45 Apoptosis", Immunologic Res. 35(3):249-262); serie **E1** (grupo sanguíneo B) como se encuentra en el cáncer de páncreas; **EGFR** (Receptor del factor de crecimiento epidérmico; Adenis, A. et al. 2003 Bull Cancer. 90 Spec No:S228-32); **receptores de efrina** (y en particular **EphA2** (Patente de Estados Unidos Nº 7.569.672; Publicación de PCT Nº WO 06/084226); **Erb** (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. et al. 2002 Oncogene 21(57):8732-8740; Rimon, E. et al. 2004 Int J Oncol. 24(5): 1325-1338); **GAGE** (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. et al. 2006 Int J Cancer. 118(1): 123-128); **GD2/GD3/GM2** (Livingston, P.O. et al. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-1025); **gangliósido GD2** (G<sub>D2</sub>; Saleh et al. (1993) "Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen, " J. Immunol., 151, 3390-3398); **gangliósido GD3** (G<sub>D3</sub>; Shitara et al. (1993) "A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities", Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380); **gangliósido GM2** (G<sub>M2</sub>; Livingston et al. (1994) "Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside", J. Clin. Oncol. 12:1036-1044); **50**

5 **gangliósido GM3** ( $G_{M3}$ ; Hoon et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers, " *Cancer Res.* 53:5244-5250); **GICA 19-9** (Herlyn et al. (1982) "Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma, " *J. Clin. Immunol.* 2:135-140); **gp100** (Lotem, M. et al. 2006 *J Immunother.* 29(6):616-27); **Gp37** (antígeno de células T de leucemia humana; Bhattacharya-Chatterjee et al. (1988) "Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Abl, Ab2, and Ab3), " *J. Immunol.* 141:1398-1403); **gp75** (antígeno de melanoma; Vijayasaradhi et al. (1990) "The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product, " *J. Exp. Med.* 171(4):1375-1380); **gpA33** (Heath, J.K. et al. (1997) "The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 94(2):469-474; Ritter, G. et al. (1997) "Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(3):682-686; Wong, N.A. et al. (2006) "EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia", *J. Clin. Pathol.* 59(3):260-263); **antígeno HER2** (HER2/neu, p185<sup>HER2</sup>; Kumar, Pal S et al. 2006 *Semin Oncol.* 33(4):386-91); **HMFG** (antígeno de glóbulos de grasa de la leche materna; WO1995015171); **virus del papiloma humano-E6/virus del papiloma humano-E7** DiMaio, D. et al. 2006 *Adv Virus Res.* 66:125-59; **HMW-MAA** (high molecular weight melanoma antigen; Natali et al. (1987) "Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance, " *Cancer* 59:55-63; Mittelman et al. (1990) "Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With 10 Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Invest.* 86:2136-2144); **antígeno I** (antígeno de diferenciación; Feizi (1985) "Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens", *Nature* 314:53-57); **IL13Ra2** (Publicación de PCT Nº WO 2008/146911; Brown, C.E. et al. (2013) "Glioma IL13Ra2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression And Poor Patient Prognosis", *PLoS One.* 18(8):e77769; Barderas, R. et al. (2012) "High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is Associated With Invasion, Liver Metastasis, And Poor Prognosis", *Cancer Res.* 72(11):2780-2790; Kasaian, M.T. et al. (2011) "IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13Ra2", *J. Immunol.* 187(1):561-569; Bozinov, O. et al. (2010) "Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Ra2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas", *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 50(8):617-621; Fujisawa, T. et al. (2009) "A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis", *Cancer Res.* 69(22):8678-8685); **integrina β6** (Publicación de PCT Nº WO 03/087340); **JAM-3** (Publicación de PCT Nº WO 06/084078); **KID3** (Publicación de PCT Nº WO 05/028498); **KID31** (Publicación de PCT Nº WO 06/076584); **Antígeno de pancarcinoma KS 1/4** (Perez et al. (1989) "Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker, " *J. Immunol.* 142:3662-3667; Möller et al. (1991) "Bi-specific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes", *Cancer Immunol. Immunother.* 33(4):210-216; Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); **L6** y **L20** (antígenos de carcinoma de pulmón humano; Hellstrom et al. (1986) "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma", *Cancer Res.* 46:3917-3923); **LEA**; **LUCA-2** (Publicación de Patente de Estados Unidos Nº 2006/0172349; Publicación de PCT Nº WO 06/083852); **M1:22:25:8**; **M18**; **M39**; **MAGE** (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); **MART** (Kounalakis, N. et al. 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):377-82); **mesotelina** (Chang K, and Pastan I. 1996 "Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers", *Proc Natl Acad Sci USA* 93:136-40); **MUC-1** (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46); **MUM-1** (Castelli, C. et al. 2000 *J Cell Physiol.* 182(3):323-31); **Myt**; **N-acetilglucosaminiltransferasa** (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta.* 6; 1473(1):21-34); **neoglicoproteína**; **NS-10** como se encuentra en adenocarcinomas; **OFA-1**; **OFA-2**; **Oncostatina M** (receptor beta de oncostatina; Patente de Estados Unidos Nº 7.572.896; Publicación de PCT Nº WO 06/084092); **p15** (Gil, J. et al. 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):667-77); **p97** (antígeno asociado a melanoma; Estin et al. (1989) "Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97", *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6):445-454); **PEM** (mucina epitelial polimórfica; Hilkens et al. (1992) "Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property", *Trends in Biochem. Sci.* 17:359-363); **PEMA** (**antígeno de mucina epitelial polimórfica**); **PIPA** (Patente de Estados Unidos Nº 7.405.061; Publicación de PCT Nº WO 04/043239); **PSA** (antígeno prostático específico; Henttu et al. (1989) "cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 10(2):903-910; Israeli et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen, " *Cancer Res.* 53:227-230; Cracco, C.M. et al. 2005 *Minerva Urol Nefrol.* 57(4):301-11); **PSMA** (antígeno de membrana específico de la próstata; Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-180); **fosfato de ácido prostático** (Tailor et al. (1990) "Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone", *Nucl. Acids Res.* 18(16):4928); **R<sub>24</sub>** como se encuentra en melanoma; **ROR1** (Patente de Estados Unidos Nº 5.843.749); **esfingolípidos**; **SSEA-1**; **SSEA-3**; **SSEA-4**; **sTn** (Holmberg, LA 2001 *Expert Opin Biol Ther.* 1(5):881-91); **péptido derivado del receptor de células T** de un linfoma cutáneo de células T (ver Edelson (1998) "Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy, " *Cancer J Sci Am.* 4:62-71); **TsA<sub>7</sub>** encontrado en las células mieloídes; **TAG-72** (Yokota et al. (1992) "Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms, " *Cancer Res.* 52:3402-3408); **TL5** (grupo sanguíneo A); **Receptor de TNF** (receptor de TNF- $\alpha$ , receptor de TNF- $\beta$ ; receptor de **TNF-γ** (van Horsen, R. et al. 2006 *Oncologist.* 11(4):397-408; Gardnerova, M. et al. 2000 *Curr Drug Targets.* 1(4):327-64); **TRA-1-85** (grupo sanguíneo 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65

H); **receptor de transferrina** (Patente de Estados Unidos Nº 7.572.895; Publicación de PCT Nº WO 05/121179); **5T4** (TPBG, glucoproteína de trofoblasto; Boghaert, E.R. et al. (2008) The Oncofetal Protein, 5T4, Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin<sup>®</sup>, Int. J. Oncol. 32(1):221-234; Eisen, T. et al. (2014) "Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel Immunotoxin", Curr. Oncol. Rep. 16:370, pp. 1-6); **TSTA (antígeno de trasplante específico de tumor)**, como los antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo los virus tumorales de ADN del antígeno T y los antígenos de la envoltura de los virus tumorales de ARN, el antígeno oncofetal-alfa-fetoproteína como el CEA del colon, el antígeno oncofetal del tumor de la vejiga (Hellstrom et al. (1985) "Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas, " Cancer. Res. 45:2210-2188); **VEGF** (Pietrantonio, F. et al. (2015) "Quimioterapia neoadyuvante basada en bevacizumab para metástasis hepáticas de cáncer colorrectal: Errores y trucos útiles en una revisión para médicos, "Crit. Rev. Oncol. Hematol. 95 (3): 272-281; Grabowski, J.P. (2015) "Bevacizumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy For Colorectal Cancer Liver Metastases: Pitfalls And Helpful Tricks In A Review For Clinicians", Crit. Rev. Oncol. Hematol. 95(3):272-281; Grabowski, J.P. (2015) "Current Management Of Ovarian Cancer", Minerva Med. 106(3):151-156; Field, K.M. (2015) "Bevacizumab And Glioblastoma: Scientific Review, Newly Reported Updates, And Ongoing Controversies", Cancer 121(7):997-1007; Suh, D.H. et al. (2015) "Major Clinical Research Advances In Gynecologic Cancer In 2014", J. Gynecol. Oncol. 26(2):156-167; Liu, K.J. et al. (2015) "Bevacizumab In Combination With Anticancer Drugs For Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer", Tumour Biol. 36(3): 1323-1327; Di Bartolomeo, M. et al. (2015) "Bevacizumab treatment in the elderly patient with metastatic colorectal cancer", Clin. Interv. Aging 10:127-133); **Receptor de VEGF** (O'Dwyer, P.J. 2006 Oncologist. 11(9):992-998); **VEP8; VEP9; VIM-D5; y haptene Y, Le<sup>y</sup>** como se encuentra en células de carcinoma embrionario.

En ciertas reivindicaciones, tales moléculas de unión anti-PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, se usan en combinación con una o más moléculas que se unen específicamente a 5T4, B7H3, CD19, CD20, CD51, CD123, DR5, EGFR, EpCam, GD2, gpA33, HER2, ROR-1, TAG-72, anticuerpo VEGF-A y/o VEGFR2.

Tales moléculas de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 4-6, pueden combinarse con un agente inmunogénico como una vacuna contra el tumor. Tales vacunas pueden comprender antígenos tumorales purificados (incluyendo moléculas de proteínas recombinantes, péptidos y carbohidratos), células tumorales autólogas o alogénicas. Se han descrito una serie de estrategias de vacunas tumorales (ver, por ejemplo, Palena, C., et al., (2006) "Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies", Adv. Cancer Res. 95, 115-145; Mellman, I., et al. (2011) "Cancer immunotherapy comes of age", Nature 480, 480-489; Zhang, X. M. et al. (2008) "The anti-tumor immune response induced by a combination of MAGE-3/MAGE-n-derived peptides", Oncol. Rep. 20, 245-252; Disis, M. L. et al. (2002) "Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines", J. Clin. Oncol. 20, 2624-2632; Vermeij, R. et al. (2012) "Potentiation of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: a single-arm phase II study." Int. J. Cancer 131, E670-E680). Tales moléculas de unión a PD-1 de la divulgación pueden combinarse con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58:5301-5304).

Moléculas de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden combinarse con otras moléculas inmunoestimuladoras como anticuerpos que activan la respuesta inmunitaria del huésped para proporcionar niveles aumentados de activación de células T. En particular, se ha demostrado que los anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-CTLA-4 activan el sistema inmunitario (ver, por ejemplo, del Rio, M.-L. et al. (2005) "Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation", Eur. J. Immunol 35:3545-3560; Barber, D. L. et al. (2006) "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", Nature 439, 682-687; Iwai, Y. et al. (2002) "Involvement Of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System And Tumor Immunotherapy By PD-L1 Blockade", Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 12293-12297; Leach, D. R., et al., (1996) "Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade", Science 271, 1734-1736). Las moléculas inmunoestimuladoras adicionales que pueden combinarse con las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación incluyen anticuerpos contra moléculas en la superficie de células dendríticas que activan la función de células dendríticas (DC) y presentación de antígenos, anticuerpos anti-CD40 capaces de sustituir la actividad auxiliar de células T y anticuerpos activadores contra moléculas coestimuladoras de células T como PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB, e ICOS (ver, por ejemplo, Ito et al. (2000) "Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies", Immunobiology 201:527-40; Patente de Estados Unidos Nº 5.811.097; Weinberg et al. (2000) "Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity", Immunol 164:2160-2169; Melero et al. (1997) "Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors", Nature Medicine 3: 682-685; Hutloff et al. (1999) "ICOS Is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related To CD28", Nature 397: 263-266; y Moran, A.E. et al. (2013) "The TNFRs OX40, 4-14BB, and CD40 As Targets For Cancer Immunotherapy", Curr Opin Immunol. Abril de 2013; 25(2): 10.1016/j.co.2013.01.004), y o receptores de antígenos químicos (**CAR**) estimuladores que comprenden un dominio de unión a antígeno dirigido contra un antígeno de enfermedad fusionado con uno o más dominios de señalización intracelular de varios

receptores de proteína scoestimuladores (por ejemplo, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, etc.) que sirven para estimular las células T tras unirse al antígeno (ver, por ejemplo, Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor", Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells", Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia", Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo", Leukemia doi: 10.1038/leu.2014.62).

5 Moléculas de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden combinarse con receptores de antígenos quiméricos inhibidores (iCAR) para desviar las respuestas de inmunoterapia objetivo. iCAR es un dominio de unión a antígeno dirigido contra un antígeno de enfermedad fusionado con uno o más dominios de señalización intracelular de varios receptores de proteínas inhibitorias (por ejemplo, CTLA-4, PD-1, etc.) que sirven para restringir las respuestas de las células T tras la unión del antígeno (ver, por ejemplo, Fedorov V.D. (2013) "PD-1-and CTLA-4 BasedInhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Diver Off-Target Immunotherapy Responses," Sci. Tranl. Med. 5:215ra172 doi:10.1126/scitranslmed.3006597.

10 15 En particular, tales moléculas de unión anti-PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, se usan en combinación con un anticuerpo anti-CD137, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-TIM-3 y/o una vacuna contra el cáncer.

20 25 **B. Utilidad diagnóstica y teranóstica**

30 35 Algunas de las moléculas de unión a PD-1 divulgadas en este documento presentan poca o ninguna capacidad para bloquear la unión entre PD-1 y el ligando PD-1L. Como tales, los anticuerpos PD-1 mAb 2 y PD-1 mAb 4, sus derivados humanizados y moléculas que comprenden sus fragmentos de unión a PD-1 (por ejemplo, diacuerpos biespecíficos, etc.) o que compiten por la unión con tales anticuerpos pueden ser marcados detectablemente (por ejemplo, con fracciones de marcado radiactivas, enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, paramagnéticas, diamagnéticas u otras) y se usan en la detección de PD-1 en muestras o en la imagenología de PD-1 en células. Como tales moléculas no afectan a la actividad biológica de PD-1, son particularmente útiles en métodos para determinar la extensión, localización y cambio en la expresión de PD-1 en sujetos (por ejemplo, sujetos que están siendo tratados por cáncer asociado con la expresión o direccionamiento de PD-1).

40 **XII. Composiciones farmacéuticas**

45 50 Las composiciones incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Tales composiciones pueden comprender una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, o una combinación de tales agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones de la divulgación pueden comprender una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 60 Tales composiciones farmacéuticas pueden incluir adicionalmente un segundo anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular y un portador vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuate, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o

emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

5 Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, 10 puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

15 Las composiciones pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las formadas con aniones como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaina, etc.

20 Un kit puede comprender cualquiera de las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6. El kit puede comprender además uno o más de otros agentes profilácticos y/o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes; y/o el kit 25 puede comprender además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos del cáncer asociados con el cáncer. En ciertas realizaciones, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otras realizaciones, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

### 25 XIII. Métodos de administración

30 Se conocen varios sistemas de administración y pueden usarse para administrar las composiciones divulgadas en este documento, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc.

35 Los métodos de administración de una molécula de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosal (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una realización específica, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante 40 infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante. Ver, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nº 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 45 5.290.540; y 4.880.078; y Publicaciones de PCT Nº WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

50 Las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, se pueden envasar en un recipiente herméticamente sellado como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de la molécula. Tales moléculas se pueden suministrar como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. Preferiblemente, las moléculas de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente 55 herméticamente sellado.

55 Las moléculas de unión a PD-1 liofilizadas de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, deben almacenarse a entre 2º C y 8º C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse dentro de las 12 horas, preferiblemente en el plazo de 6 horas, en el plazo de 5 horas, en el plazo de 3 horas., o en el plazo de 1 hora después de ser reconstituido. En una realización alternativa, tales moléculas se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferiblemente, tales moléculas de unión a PD-1, cuando se proporcionan en forma líquida, se suministran en un recipiente herméticamente sellado.

60 65 La cantidad de la composición que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más

síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*.

Como se usa en la presente, una **"cantidad eficaz"** de una composición farmacéutica, es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados que incluyen, sin limitación, resultados clínicos como la disminución de los síntomas resultantes de la enfermedad, la atenuación de un síntoma de infección (por ejemplo, carga viral, fiebre, dolor, sepsis, etc.) o un síntoma de cáncer (por ejemplo, la proliferación de células cancerosas, presencia de tumores, metástasis tumorales, etc.), aumentando de este modo la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, disminuyendo la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, potenciando el efecto de otro medicamento, por ejemplo, a través del direccionamiento y/o internalización, retrasando la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones. Una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para reducir la proliferación (o el efecto de) la presencia viral y para reducir y/o retrasar el desarrollo de la enfermedad viral, ya sea directa o indirectamente. En algunos casos, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede lograrse o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, una "cantidad eficaz" puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos, y puede considerarse que un solo agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, puede lograrse o se logra un resultado deseable. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades efectivas de cada componente está dentro del conocimiento de la técnica.

Para las moléculas de unión a PD-1 abarcadas por la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, la dosificación administrada a un paciente se determina preferiblemente en base al peso corporal (kg) del sujeto receptor. Para las moléculas de unión a PD-1 abarcadas por la invención, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de por lo menos aproximadamente 0,01 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,05 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,1 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,2 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,5 µg/kg, por lo menos aproximadamente 1 µg/kg, por lo menos aproximadamente 2 µg/kg, por lo menos aproximadamente 5 µg/kg, por lo menos aproximadamente 10 µg/kg, por lo menos aproximadamente 20 µg/kg, por lo menos aproximadamente 50 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,1 mg/kg, por lo menos aproximadamente 1 mg/kg, por lo menos aproximadamente 3 mg/kg, por lo menos aproximadamente 5 mg/kg, por lo menos aproximadamente 10 mg/kg, en por lo menos aproximadamente 30 mg/kg, por lo menos aproximadamente 50 mg/kg, por lo menos aproximadamente 75 mg/kg, por lo menos aproximadamente 100 mg/kg, por lo menos aproximadamente 125 mg/kg, por lo menos aproximadamente 150 mg/kg o más del peso corporal del sujeto.

La dosificación y la frecuencia de administración de una molécula de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, pueden reducirse o alterarse mejorando la captación y la penetración tisular de la molécula mediante modificaciones como, por ejemplo, lipidación.

La dosificación de una molécula de unión a PD-1 de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, administrada a un paciente puede calcularse para su uso como terapia con un agente individual. Alternativamente, la molécula puede usarse en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es menor que cuando dichas moléculas se usan como terapia con un agente individual.

Las composiciones farmacéuticas divulgadas en este documento pueden administrarse localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, por inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, como membranas o fibras sialísticas. Preferiblemente, cuando se administra una molécula de la invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, se debe tener cuidado de usar materiales en los que no se absorba la molécula.

Las composiciones divulgadas en esto documento pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., in LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein *ibid.* pp. 317-327).

Las composiciones divulgadas en este documento pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden una o más de las moléculas de unión a PD-1 de la

divulgación. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.526.938; Publicación de PCT WO 91/05548; Publicación de PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En un caso, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (ver Langer, *supra*; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," Surgery 88:507-516; y Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otro caso, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de las moléculas (ver, por ejemplo, MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," J. Neurosurg. 7(1): 105-112; Patente de Estados Unidos Nº 5.679.377; Patente de Estados Unidos Nº 5.916.597; Patente de Estados Unidos Nº 5.912.015; Patente de Estados Unidos Nº 5.989.463; Patente de Estados Unidos Nº 5.128.326; Publicación de PCT Nº WO 99/15154; y Publicación de PCT Nº WO 99/20253). Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, polí(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólicos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilamida, poli(etylenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólicos) (PLGA), y poliortoésteres. Puede colocarse un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico (por ejemplo, los pulmones), por lo que solo se requiere una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, en MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada pueden usarse de acuerdo con Dunn et al. (Ver US 5,945,155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada *in situ* del material bioactivo del sistema polimérico. La implantación puede producirse generalmente en cualquier parte del cuerpo del paciente con necesidad de tratamiento terapéutico. Puede usarse un sistema de administración sostenida no polimérico, mediante el cual se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como sistema de administración de fármacos. Tras la implantación en el cuerpo, el solvente orgánico del implante se disipará, dispersará o lixiviará de la composición al fluido tisular circundante, y el material no polimérico se coagulará o precipitará gradualmente para formar una matriz microporosa sólida (ver US 5.888.533).

Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención, referidos en este documento. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.526.938; Publicaciones internacionales Nº WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una molécula de unión a PD-1 de la presente invención, tal como se define y para su uso de conformidad con las reivindicaciones 1-6, puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto es tratado con dicho diacuerpo una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. Las composiciones farmacéuticas divulgadas en este documento pueden administrarse una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosis efectiva de las moléculas utilizadas para el tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo de un tratamiento concreto.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran varios métodos para composiciones en los métodos de diagnóstico o tratamiento.

**Ejemplo 1****Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humana**

5 Se aislaron quince anticuerpos monoclonales murinos por ser capaces de unirse específicamente a PD-1 tanto humana como de mono cynomolgus, y se les asignó las designaciones "PD-1 mAb 1," "PD-1 mAb 2," "PD-1 mAb 3," "PD-1 mAb 4," "PD-1 mAb 5," "PD-1 mAb 6," "PD-1 mAb 7," "PD-1 mAb 8," "PD-1 mAb 9," "PD-1 mAb 10," "PD-1 mAb 11," "PD-1 mAb 12," "PD-1 mAb 13," "PD-1 mAb 14," y "PD-1 mAb 15." Se descubrió que 10 las CDR de estos anticuerpos difieren y se han proporcionado con anterioridad. La unión al dominio extracelular de PD-1 humana y de mono cynomolgus se evaluó de la siguiente manera, se recubrieron placas maxisorb de 96 pocillos de fondo plano con PD-1 soluble humana o de mono cynomolgus (el dominio extracelular de PD-1 humana fusionado a una etiqueta His (shPD-1 His) o una región Fc humana (shPD-1 hFc), o el dominio extracelular de PD-1 de mono cynomolgus fusionado a una región Fc humana (scyno-PD1 Fc)) cada uno a 0,5 o 1 µg/ml, las placas se 15 lavaron e incubaron con uno de los anticuerpos anti-PD-1 aislados PD-1 mAb 1-15. Para estos estudios, los anticuerpos anti-PD-1 se utilizaron a 3, 1,0, 0,3333, 0,1111, 0,0370, 0,0123 o 0,0041 µg/ml (diluciones en serie de tres veces). La cantidad de anticuerpo que se une a PD-1 inmovilizada (humana o de mono cynomolgus) se evaluó 20 usando un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG-HRP de ratón. Todas las muestras se analizaron en un lector de placas (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers). Las curvas de unión representativas para PD-1 de cynomolgus soluble y humana soluble se muestran en las **Figuras 7A-7D** y las **Figuras 8A-8C**, respectivamente.

Los resultados de estos ensayos de unión (**Figuras 7A-7D** y **Figuras 8A-8C**) muestran que todos los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se unen tanto a PD-1 humana soluble como a de mono cynomolgus soluble.

25 Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos anti-PD-1 murinos, se evaluó su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 humana soluble a PD-1 humana soluble en dos ensayos diferentes. En un ensayo, se examinó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de PD-1 humana a PD-L1 inmovilizado en una superficie. Para este ensayo, cada uno de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15, o un anticuerpo anti-PD-1 de referencia (PD-1 mAb A) se mezcló con la proteína de fusión shPD-1 His, (a 2,5 µg/ml) y se incubó por separado con PD-L1 humano 30 soluble marcado con biotina (el dominio extracelular de PD-L1 fusionado con Fc humano (sPD-L1)) a 1 µg/ml inmovilizado en una placa recubierta con estreptavidina. Para estos estudios, los anticuerpos anti-PD-1 se utilizaron a 10, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 o 0,1563 µg/ml (diluciones en serie dos veces). La cantidad de shPD-1 His que se une al sPD-L1 inmovilizado se evaluó mediante el His-Tag usando un anticuerpo secundario anti-His-Tag-HRP. 35 Todas las muestras se analizaron en un lector de placas (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers). Los resultados de este experimento se muestran en las **Figuras 9A-9D**.

40 Los resultados de estos ensayos de inhibición (**Figuras 9A-9D**) muestran que los anticuerpos anti-PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, y PD-1 mAb 15, fueron capaces de bloquear la unión de PD-L1 humano soluble a PD-1 humana soluble en varios grados mientras que PD-1 mAb 2 y PD-1 mAb 4 mostraron poca o ninguna actividad de bloqueo en este formato de ensayo.

□ [0436]

45 En el segundo ensayo, se ensayó la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 murinos PD-1 mAb 1-15 para bloquear la unión del ligando PD-1 (es decir, PD-L1 humana o PD-L2 humana) a PD-1 expresada en la superficie de las células NSO. Para este ensayo, cada uno de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15, o un anticuerpo anti-PD-1 de referencia (PD-1 mAb A o PD-1 mAb B) se mezcló por separado con un PD-L1 humano soluble biotinilado (proteína de fusión shPD-L1) o proteína de fusión PD-L2-mulgFc humana soluble biotinilada (shPD-L2; Ancell N° de Cat 573-030), cada una a 0,1 µg/prueba, y se incubaron con células NSO que expresan PD-1 humana (~250.000 células/pocillo) en tampón de bloqueo (FACS + albúmina de suero humano al 10%). Para estos estudios, los anticuerpos anti-PD-1 se utilizaron a 4,0, 1,0, 2,5 x 10<sup>-1</sup>, 6,25 x 10<sup>-2</sup>, 1,56 x 10<sup>-3</sup>, 3,90 x 10<sup>-3</sup>, 9,76 x 10<sup>-4</sup>, 2,4 x 10<sup>-4</sup>, 0,6 x 10<sup>-4</sup> µg/prueba (diluciones en serie de cuatro veces). La cantidad de unión de shPD-L1 (o shPD-L2) a la 50 superficie de las células NSO se determinó usando un anticuerpo secundario de estreptavidina conjugado con PE mediante análisis FACS. Se determinaron los valores de IC50 para la inhibición de la unión de PD-1/PD-L1 y en la **Tabla 6** se proporciona la media de la muestra (□) de por lo menos dos experimentos (excepto donde se indique).

**Tabla 6**

Anticuerpo anti-PD-1	IC50 (µg/prueba)	Anticuerpo anti-PD-1	IC50 (µg/prueba)
PD-1 mAb A	0,0044	PD-1 mAb 8	0,6611 ‡
PD-1 mAb B	0,0064	PD-1 mAb 9	0,0154
PD-1 mAb 1	0,0048	PD-1 mAb 10	0,0057
PD-1 mAb 2	0,0110	PD-1 mAb 11	0,0259 ‡
PD-1 mAb 3	0,0361 ‡	PD-1 mAb 12	0,0238 ‡
PD-1 mAb 4	0,0156 ‡	PD-1 mAb 13	0,0117
PD-1 mAb 5	0,0039	PD-1 mAb 14	0,0149 ‡
PD-1 mAb 6	0,0051	PD-1 mAb 15	0,0060
PD-1 mAb 7	0,0024		

‡ Resultados de un solo experimento

5

Los resultados de los ensayos de inhibición de shPD-L1 (**Tabla 6**) muestran que los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, y PD-1 mAb 15, fueron capaces de bloquear la unión de PD-L1 humana a PD-1 humana expresada en la superficie de las células NSO. En particular, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 10 y PD-1 mAb 15 bloquearon la unión de shPD-L1 tan bien como o mejor que los anticuerpos de referencia PD-1 (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B), mientras que PD-1 mAb 8 era esencialmente no bloqueante en este formato de ensayo. Tanto PD-1 mAb 2 como PD-1 mAb 4 pudieron bloquear la unión de PD-1/PD-L1 en este formato de ensayo.

De manera similar, los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2 y PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, fueron capaces de bloquear la unión de PD-L2 humano a PD-1 humana expresada en la superficie de las células NSO, mientras que PD-1 mAb 8 era esencialmente no bloqueante en este formato de ensayo. En particular, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7 y PD-1 mAb 10 bloquearon la unión de shPD-L2 tan bien como o mejor que los anticuerpos PD-1 de referencia (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B). Los anticuerpos de PD-1 PD-1 mAb 11 y PD-1 mAb 15 no se probaron en este ensayo. A continuación se proporcionan los resultados para varios anticuerpos anti-PD-1 humanizados que incluyen hPD-1 mAb 15.

## 25 Ejemplo 2

### Humanización y caracterización adicional

Los dominios variables de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 se humanizaron, donde se identificaron los epítopos antigenicos los anticuerpos se desinmunizaron adicionalmente para generar los dominios variables humanizados finales. La humanización de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2 y PD-1 mAb 15 produjo un dominio VH humanizado y un dominio VL humanizado para cada anticuerpo designado en la presente como "hPD-1 mAb 1 VH1," and "hPD-1 mAb 1 VL1;" "hPD-1 mAb 2 VH1," y "hPD-1 mAb 2 VL1;" y "hPD-1 mAb 15 VH1" y "hPD-1 mAb 15 VL1". La humanización de PD-1 mAb 7 produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como "hPD-1 mAb 7 VH1", y tres dominios VL humanizados designados en la presente como "hPD-1 mAb 1 VL1", "hPD-1 mAb 7 VL2" y "hPD-1 mAb 7 VL3". La humanización de PD-1 mAb 9 produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como "hPD-1 mAb 9 VH1" y "hPD-1 mAb 9 VH2", y dos dominios VL humanizados designados en la presente como "hPD-1 mAb 9 VL1, " y "hPD-1 mAb 1 VL2". Donde se generaron múltiples dominios variables humanizados, los dominios variables humanizados de cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-PD-1 particular (por ejemplo, PD-1 mAb 7) puede usarse en cualquier combinación y las combinaciones particulares de cadenas humanizadas se denominan por referencia a los dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hPD-1 mAb 7 VH1 y hPD-1 mAb 7 VL2 se hace referencia específicamente como "hPD-1 mAb 7 (1.2)". Se generaron anticuerpos humanizados de longitud completa con una región constante de IgG1 humana que comprende las sustituciones L234A/L235A (IgG1 (AA)) o una región constante de IgG4 humana que comprende la sustitución S228P (IgG4 (P)).

Las cadenas pesadas de anticuerpos humanizados de IgG1 de longitud completa se construyeron de la siguiente manera: el extremo C-terminal del dominio VH humanizado se fusionó con el extremo N-terminal de una región constante de IgG1 humana que tiene un dominio CH2-CH3 variante (que comprende las sustituciones L234A/L235A (AA)) y que carecen del residuo de lisina C-terminal (**SEQ ID NO: 255**):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 55 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP  
 KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS  
 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK  
 60 EYKCKVSNKA LPAPIEKTI S KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC  
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPPV LDSDGFFLY SKLTVDKSRW  
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

65 En la **SEQ ID NO: 255**, los residuos de aminoácidos 1-98 corresponden al dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID**

NO: 10), los residuos de aminoácidos 99-113 corresponden a la región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**) y los residuos de aminoácidos 114-329 corresponden al dominio CH2-CH3 de IgG1 que comprende las sustituciones L234A/L235A (subrayadas) (**SEQ ID NO: 5**) pero que carece del residuo de lisina C-terminal.

5 La secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo humanizado ejemplar ((hPD-1 mAb 7 (1.2)) que tiene una región constante de la cadena pesada de IgG1 que comprende la mutación L234A/L235A y que carece del residuo de lisina C-terminal es (**SEQ ID NO: 265**):

10 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
15 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTV PSSSLGTQTY  
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK  
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
20 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVLL  
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

25 En la **SEQ ID NO: 265**, los residuos de aminoácidos 1-119 corresponden al dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1 (**SEQ ID NO: 147**), los residuos de aminoácidos 120-217 corresponden al dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**), los residuos 218-232 corresponden a la región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**) y los residuos 233-448 corresponden al dominio CH2-CH3 de IgG1 que comprende las sustituciones L234A/L235A (subrayadas) (**SEQ ID NO: 5**) pero que carece del residuo de lisina C-terminal.

30 Las cadenas pesadas del anticuerpo humanizado de IgG4 de longitud completa se construyeron de la siguiente manera: el extremo C-terminal del dominio VH humanizado se fusionó con el extremo N-terminal de una región constante de IgG4 humana que tiene una región bisagra estabilizada (que comprende la sustitución S228P) y que carece del residuo de lisina C-terminal (**SEQ ID NO: 256**):

35 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES  
40 KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED  
PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK  
45 GFYPSDIAVE WESNGQOPENN YKTTPPVLDSD DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG  
NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

50 En la **SEQ ID NO: 256**, los residuos de aminoácidos 1-98 corresponden al dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**), los residuos de aminoácidos 99-110 corresponden a la región bisagra de IgG4 estabilizada que comprende las sustituciones de S228P (subrayadas) (**SEQ ID NO: 13**) y los residuos de aminoácidos 111-326 corresponden al dominio CH2-CH3 de IgG4 (**SEQ ID NO: 4**) pero carecen del residuo de lisina C-terminal.

55 La secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo humanizado ejemplar ((hPD-1 mAb 7 (1.2)) que tiene una región constante de cadena pesada de IgG4 que comprende una región bisagra estabilizada que tiene la mutación S228P y que carece del residuo de lisina C-terminal es (**SEQ ID NO: 266**):

60 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD  
TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA PEFLGGPSVF LFPPPKPKDTL  
65 MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR  
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL  
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQOPENNY KTTPPVLDSD  
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLG

5

En la **SEQ ID NO: 266**, los residuos de aminoácidos 1-119 corresponden al dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1 (**SEQ ID NO: 147**), los residuos de aminoácidos 120-217 corresponden al dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**), los residuos de aminoácidos 218-229 corresponden a la región bisagra de IgG4 estabilizada que comprende las sustituciones de S228P (subrayadas) (**SEQ ID NO: 13**) y los residuos de aminoácidos 230-445 corresponden al dominio CH2-CH3 de IgG4 (**SEQ ID NO: 4**) pero sin el residuo de lisina C-terminal.

10

Se construyeron cadenas ligeras de anticuerpos humanizados de longitud completa de la siguiente manera: el extremo C-terminal del dominio VL humanizado se fusionó con el extremo N-terminal de una región kappa de cadena ligera humana (**SEQ ID NO: 8**). La misma cadena ligera está emparejada con las cadenas pesadas de IgG1 (AA) e IgG4 (P).

15

La secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un anticuerpo PD-1 humanizado ejemplar (hPD-1 mAb 7 (1.2)) que tiene una región constante kappa es (**SEQ ID NO: 264**):

20

25

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSPRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
 30 QWKVDNALQSQNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLSKADY EHKVYACEV  
 THQGLSSPVTKSFNRGEC

35

En la **SEQ ID NO: 264**, los residuos de aminoácidos 1-111 corresponden al dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL2 (**SEQ ID NO: 153**), y los residuos de aminoácidos 112-218 corresponden a la región constante kappa de la cadena ligera (**SEQ IS NO: 8**).

40

Los anticuerpos anti-PD-1 que tienen regiones constantes alternativas, por ejemplo, regiones Fc modificadas genéticamente, se generan fácilmente incorporando diferentes regiones constantes y/o introduciendo una o más sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos. Por ejemplo, cuando se desea un anticuerpo biespecífico, se utilizan dominios CH2-CH3 portadores de botones y agujeros para facilitar la heterodimerización. Los anticuerpos quiméricos anti-PD-1 que comprenden los dominios variables murinos y las regiones constantes humanas se generan como se ha descrito anteriormente.

45

Se probaron los anticuerpos humanizados (IgG1 (AA) y/o IgG4 (P)) para determinar la actividad de unión y bloqueo como se ha descrito anteriormente. La unión a PD-1 humana (shPD-1 His y shPD-1 hFc) y PD-1 de mono cynomolgus (shPD-L1 hFc) de los anticuerpos humanizados fue comparable a la del anticuerpo murino correspondiente. Además, los anticuerpos humanizados retuvieron la capacidad de bloquear la unión de PD-L1 humana a PD-1 humana en un ensayo ELISA.

50

La cinética de unión de los anticuerpos murinos PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 15, los anticuerpos humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1), hPD-1 mAb 15 y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B se investigaron usando análisis Biacore. Los anticuerpos anti-PD-1 se capturaron en la proteína A inmovilizada y se incubaron con PD-1 humana soluble marcada con His (shPD-1-His) o fusión PD-1 Fc de mono cynomolgus humano soluble (scyno PD-1 hFc) escindida para eliminar la porción Fc, y la cinética de unión se determinó mediante análisis Biacore. En estudios adicionales, los anticuerpos anti-PD-1 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), y PD-1 mAb B IgG4 (P), se capturaron en Fc antihumano de cabra F(ab)<sub>2</sub> inmovilizado y la cinética de unión se determinaron mediante análisis Biacore como se ha descrito anteriormente. Los *ka*, *kd* y *KD* calculados a partir de estos estudios se presentan en la **Tabla 7**.

65

Tabla 7						
Captura de proteína A						
Anticuerpo anti-PD-1		humano <sup>a</sup>			Mono Cynomolgus <sup>b</sup>	
		$k_a \times 10^4$	$k_d \times 10^{-4}$	KD (nM)	$k_a \times 10^4$	$k_d \times 10^{-4}$
5	PD-1 mAb A	60	18	3	14	9,6
10	PD-1 mAb B	140	35	2.5	37	12
15	PD-1 mAb 7	21	2.8	1.3	17	6
20	hPD-1 mAb 7 (1,2)	110	4.3	0,39	37	6.4
25	PD-1 mAb 9	4.3	4.2	9,8	2.2	16
30	hPD-1 mAb 9 (1,1)	1.8	6.5	36,1	1,5	11
35	PD-1 mAb 15	4.5	1.3	2.9	2,7	11
40	hPD-1 mAb 15	2.4	3.2	13,3	2.3	18
45	PD-1 mAb 2	5.5	5,6	10,2	4.2	6.0
50	hPD-1 mAb 2	3.2	1,6	5,0	2.3	3.9
55	Captura de Fc antihumano de cabra F(ab) <sub>2</sub>					
60	PD-1 mAb A IgG1 (AA)	13	8.4	6.5	8.1	4.5
65	PD-1 mAb A IgG4 (P)	13	7,9	6.1	8.4	5,0
70	PD-1 mAb B IgG1 (AA)	25	28	11,2	20	6.4
75	PD-1 mAb B IgG4 (P)	26	25	9,6	20	7,9
80	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG1 (AA)	25	3.8	1,5	16	7.8
85	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	27	4.1	1,5	17	7.8
90	(continuación)					
95	hPD-1 mAb 9 (1,1) IgG1 (AA)	5,6	6.1	10,9	5,6	5.2
100	hPD-1 mAb 9 (1,1) IgG4 (P)	6.1	5.8	9.5	4.9	7.4
105	<sup>a</sup> PD-1 humana soluble marcada con His (shPD-1 His)					
110	<sup>b</sup> PD-1 de mono cynomolgus soluble (scyno PD-1 hFc) escindido					

Los resultados demuestran que PD-1 mAb 7 y el hPD-1 mAb 7 (1.2) humanizado muestran una mejor cinética de unión con respecto a los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B. PD-1 mAb 2, y hPD-1 mAb 2 muestran cinética de unión dentro de aproximadamente el doble de los anticuerpos anti-PD-1 de referencia, mientras que PD-1 mAb 9, hPD-1 mAb 9 (1,1), PD-1 mAb 15 y hPD-1 mAb 15 muestran una cinética de unión dentro de aproximadamente 2-6 veces de los anticuerpos anti-PD-1 de referencia.

Se investigó la especificidad de tejido del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7. Se puso en contacto tejido normal con PD-1 mAb 7 o con un control de isotipo (0,313 µg/ml) y se visualizó la extensión de la tinción. Se usa Bloxall para el bloqueo de enzimas endógenas para reducir la tinción con mucina inespecífica en el tejido del colon. Como se muestra en la **Figura 10A, paneles i-xii**, PD-1 mAb 7 y el control de isotipo fallaron ambos en el marcado de células de tejido normal de colon, hígado, pulmón, páncreas, riñón y corazón. Además, PD-1 mAb 7 y el control de isotipo no lograron teñir la piel normal (**Figura 10B, paneles i-ii**). Por el contrario, se descubrió que PD-1 mAb 7 marcaba fuertemente los linfocitos presentes en el tejido normal de las amígdalas y las células NSO transfectadas con PDCD1 que expresaban PD-1 (**Figura 10B, Paneles iii y v**), mientras que el control de isotipo tampoco pudo marcar (**Figura 10B, Paneles iv y vi**). Los resultados presentados en las **Figuras 10A-10B** por tanto, indican que PD-1 mAb 7 era capaz de unirse específicamente a linfocitos y células que expresan PD-1.

Se examinaron los perfiles de saturación de unión de hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1mAb B. Brevemente, cada uno de los anticuerpos anti-PD-1, PD-1 mAb 1-15, o los anticuerpos anti-PD-1 de referencia (PD-1 mAb A y PD-1 mAb B) se mezcló con células NSO que expresan PD-1 humana (~250.000 células/pocillo) en tampón de bloqueo (FACS + albúmina de suero humano al 10%). Para estos estudios, los anticuerpos anti-PD-1 se utilizaron a 50, 12,5, 3,13, 2,0 x 10<sup>-1</sup>, 4,9 x 10<sup>-2</sup>, 1,2 x 10<sup>-2</sup>, 3,0 x 10<sup>-3</sup>, 1,9 x 10<sup>-4</sup>, 7,6 x 10<sup>-4</sup>, 4,75 x 10<sup>-5</sup>, o 1,19 x 10<sup>-5</sup> µg/prueba (diluciones en serie de cuatro veces). La cantidad de anticuerpo que se une a la superficie de las células NSO se determinó usando anticuerpo secundario de cabra anti-APC humana mediante análisis FACS. Las curvas de saturación representativas se muestran en la **Figura 11**. Se determinaron los valores de EC50 y EC90 y en la **Tabla 8** se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) de cuatro experimentos separados.

Tabla 8				
		Unión de saturación		
		EC50 ( $\mu$ g/prueba)		EC90 ( $\mu$ g/prueba)
Anticuerpo anti-PD-1		SM	SD $\sigma$	SM
PD-1 mAb A IgG1 (AA)		0.1991	0.1309	1.4528
PD-1 mAb A IgG4 (P)		0.1581	0.1161	1.5464
PD-1 mAb B IgG1 (AA)		0.1347	0.0681	1.3917
PD-1 mAb B IgG4 (P)		0.1398	0.0951	1.1619
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)		0.4431	0.1997	2.4374
hPD-1 mAb 7 (1.1) IgG1 (AA)		0.1069	0.0500	0.9102
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)		0.1872	0.1553	0.6810
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)		0.1376	0.0926	0.6609
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)		0.3123	0.2291	1.6486
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)		0.5128	0.2228	3.0563
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)		0.2927	0.1333	2.0640
				0.6096

Los estudios de saturación de unión demuestran que las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 tienen un perfil favorable para unirse a PD-1 de la superficie celular. En particular, PD-1 mAb 7 humanizado (hPD-1 mAb 7 (1.1) y hPD-1 mAb 7 (1.2) que tienen una región Fc de IgG1 (AA) o IgG4 (P)) tienen los valores de EC90 más bajos de todos los anticuerpos examinados.

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos anti-PD-1 humanizados hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7 (1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P) y hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), se examinó su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 humana (shPD-L1) y PD-L2 humana (shPD-L2) a PD-1 expresada en la superficie de las células NSO. Estos ensayos se realizaron esencialmente como se ha descrito anteriormente. Las curvas representativas para la inhibición de la unión de sPD-L1 y sPD-L2 a PD-1 expresada en células NSO se muestran en las **Figuras 12A** y **12B**, respectivamente. Se determinaron los valores de IC50 e IC90 y en la **Tabla 9** se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD  $\sigma$ ) de tres experimentos separados.

Tabla 9								
		sPD-L1			sPD-L2			
		IC50 ( $\mu$ g/prueba)	IC90 ( $\mu$ g/prueba)	IC50 ( $\mu$ g/prueba)	IC90 ( $\mu$ g/prueba)	IC50 ( $\mu$ g/prueba)	IC90 ( $\mu$ g/prueba)	IC50 ( $\mu$ g/prueba)
Anticuerpo anti-PD-1		SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM
PD-1 mAb A IgG1 (AA)		0.0203	0.0089	0.2985	0.3279	0.0414	0.0124	0.1601
PD-1 mAb A IgG4 (P)		0.0156	0.0096	0.0776	0.0208	0.0280	0.0070	0.1594
PD-1 mAb B IgG1 (AA)		0.0148	0.0008	0.1034	0.0100	0.0280	0.0059	0.1190
PD-1 mAb B IgG4 (P)		0.0143	0.0013	0.0798	0.0239	0.0280	0.0055	0.0924
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)		0.0578	0.0124	0.2480	0.050	0.1294	0.0143	0.3813
hPD-1 mAb 7 (1.1) IgG1 (AA)		0.0166	0.0032	0.0674	0.0041	0.0283	0.0147	0.0886
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)		0.0118	0.0027	0.0678	0.0031	0.0212	0.0031	0.0672
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)		0.0103	0.0023	0.0520	0.0033	0.0213	0.0019	0.0616
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)		0.0593	0.0036	0.3238	0.0508	0.4002	0.5000	0.4573
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)		0.0460	0.0118	0.2461	0.0513	0.1105	0.0146	0.2914
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)		0.0440	0.0092	0.2068	0.035	0.0945	0.0022	0.3093
								0.0588

Los estudios de inhibición de la unión de ligandos demuestran que las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 pueden inhibir la unión de sPD-L1 y sPD-L2 a PD-1 en la superficie celular. En particular, PD-1 mAb 7 humanizado (hPD-1 mAb 7 (1.1) y hPD-1 mAb 7 (1.2)) tienen los valores de IC90 más bajos de todos los anticuerpos examinados.

### Ejemplo 3

#### Bloqueo del punto de control de PD-1/PD-L1 por anticuerpos anti-PD-1 humana humanizados

Se examinó la capacidad de hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B para antagonizar el eje PD-1/PD-L1

(es decir, bloquear la interacción PD-1/PD-L1 y prevenir la regulación por disminución de las respuestas de células T) en un ensayo indicador de luciferasa Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1. Brevemente, las células CHO que expresan PD-L1 (CHO/PD-L1) se sembraron a 40.000/pocillo en 100  $\mu$ l de medio de cultivo (RPMI + FBS al 10% + 100  $\mu$ g/ml de Higromicina B + 100  $\mu$ g/ml de G418) y se incubaron durante la noche. Al día siguiente se retiró el medio y se añadieron células Jurkat MNFAT-luc2/PD-1 (Promega) a 50.000 células/pocillo en 40  $\mu$ l en tampón de ensayo (RPMI + FBS al 2%), y anticuerpos anti-PD-1 mAb 1-15, o anticuerpos anti-PD-1 de referencia (PD-1 mAb A y PD-1 mAb B) (0-25  $\mu$ g/ml; ocho diluciones en serie de 2,5 veces en tampón de ensayo) a cada pocillo y se incubaron durante 6 horas a 37° C seguido de 5-10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 80  $\mu$ l de sustrato BioGlo (Promega) a cada pocillo y la placa se incubó durante 5-10 minutos adicionales a temperatura ambiente, se midió la luminiscencia en un lector de placas Victor. Las curvas de saturación representativas se muestran en la **Figura 13**. Se determinaron los valores de EC50 y EC90 y en la **Tabla 10** se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar ( $SD \sigma$ ) de cuatro experimentos separados.

Tabla 10						
Anticuerpo anti-PD-1	Señalización del informador					
	EC50 ( $\mu$ g/prueba)		EC90 ( $\mu$ g/prueba)			
	SM	$SD \sigma$	SM	$SD \sigma$		
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.2549	0.0480	2.4474	1.2228		
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.2049	0.0719	2.5535	1.2139		
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.2119	0.1781	2.2036	2.0118		
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.1142	0.0323	0.9418	0.2863		
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.3539	0.0983	3.8975	2.0054		
hPD-1 mAb 7 (1.1) IgG1 (AA)	0.1080	0.0386	1.1992	0.5103		
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	0.0944	0.0153	0.6452	0.2615		
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	0.0965	0.0169	0.6885	.01858		
hPD-1 mAb 9 IgG1 (AA)	0.2835	0.0530	2.9968	0.8866		
hPD-1 mAb 9 IgG4 (P)	0.3154	0.0872	5.0940	4.0496		
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.2585	0.0592	3.3138	1.0532		

Los estudios de señalización del informador demuestran que las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 pueden bloquear el eje PD-1/PD-L1 y evitarán regulación por disminución de las respuestas de las células T. En particular, PD-1 mAb 7 humanizado (hPD-1 mAb 7 (1.1) y hPD-1 mAb 7 (1.2) que tienen una región Fc de IgG1 (AA) o IgG4 (P)) tienen los valores de EC50/EC90 más bajos.

#### Ejemplo 4

##### Actividad funcional de los anticuerpos anti-PD-1 humana

La enterotoxina de *Staphylococcus aureus* tipo B (SEB) es un superantígeno microbiano capaz de activar una gran proporción de células T (5-30%) en donantes sensibles a SEB. SEB se une a MHC II fuera de la arboleda de unión de péptidos y, por lo tanto, es dependiente de MHC II, pero no está restringido y mediado por TCR. La estimulación SEB de las células T da como resultado la proliferación de células T oligoclonales y la producción de citoquinas (aunque puede observarse una variabilidad del donante y algunos donantes no responderán). En el plazo de 48 horas después de la estimulación con SEB, las PMBC regulan por incremento PD-1 y LAG-3 con una mejora adicional vista el día 5, cultivo postsecundario en placa de 96 pocillos con estimulación con SEB. La regulación por incremento de las proteínas del punto de control inmunológico PD-1 y LAG-3 después de la estimulación con SEB de las PBMC limita la liberación de citoquinas tras la reestimulación. Se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 solos y en combinación con anticuerpos anti-LAG-3 para potenciar la liberación de citoquinas a través de la inhibición del punto de control.

Brevemente, las PBMC se purificaron usando el método de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante a partir de sangre completa obtenida con el consentimiento informado de donantes sanos (Biological Specialty Corporation) y luego las células T se purificaron usando el kit de células T humanas Dynabeads® Untouched (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cultivaron PBMC purificadas en medio RPMI + FBS inactivado por calor al 10% + penicilina/estreptomicina al 1% en matraces a granel T-25 durante 2-3 días solos o con SEB (Sigma-Aldrich) a 0,1 ng/ml (estimulación primaria). Al final de la primera ronda de estimulación con SEB, las PBMC se lavaron dos veces con PBS e inmediatamente se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una concentración de 1-5 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en medio solo, medio con un control o un anticuerpo anti-PD-1, medio con SEB a 0,1 ng/ml (estimulación secundaria) y sin anticuerpo, o medio con SEB y una IgG de control o un anticuerpo anti-PD-1 +/- un anti-LAG-3 mAb, y se cultivó durante 2-3 días adicionales. Al final de la segunda estimulación, se recogieron los sobrenadantes para medir la secreción de citoquinas usando kits de ELISA DuoSet humanos para IFNy, TNF $\alpha$ , IL-10

5 e IL-4 (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Se examinó la capacidad de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 solos o en combinación con el anticuerpo anti-LAG-3 único LAG-3 mAb 1 para mejorar la liberación de citoquinas, a través de la inhibición del punto de control. Estos estudios también incluyeron uno o más de los siguientes anticuerpos anti-PD-1 de referencia: PD-1 mAb A; PD-1 mAb B; y LAG-3 mAb A, solos o en combinación. La **Figura 14** muestra los perfiles de secreción de IFN $\gamma$  de PBMC estimuladas con SEB (0,1 ng/ml) de un donante respondedor representativo (D: 38941), tratado con: sin anticuerpo; anticuerpo de control de isotipo; PD-1 mAb 7 y/o LAG-3mAb 7; PD-1 mAb 9 y/o LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 15 y/o LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 2 y/o LAG-3 mAb 1; o los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb B y/o LAG-3 mAb A (los anticuerpos se usaron a 10  $\mu$ g/ml).

15 En estudios adicionales, se examinó la capacidad de las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 (que comprenden una región Fc de IgG1 humana (AA) o de IgG4 humana (P)) así como los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B para mejorar la liberación de citoquinas mediante la inhibición del punto de control. Para estos estudios, los anticuerpos se utilizaron a 0,625, 2,5 y 10  $\mu$ g/ml. Las **Figuras 15A-15B** muestra IFN $\gamma$  (**Figura 15A**) y TNF $\alpha$  (**Figura 15B**), perfiles de secreción de PBMC estimuladas con SEB (0,2 ng/ml) de un donante respondedor representativo (D: 57709), tratado sin anticuerpo o con uno de los siguientes anticuerpos: control de isotipo; hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P); hPD-1 mAb 9 (1,1) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 9 (1,1) IgG4 (P); hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA); o los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), PD-1 mAb B IgG4 (P). Los pg/mg totales de IFN $\gamma$  en las muestras tratadas con SEB + Ab se determinaron para las muestras tratadas con los anticuerpos anti-PD-1 a 0,625, 2,5 y 10  $\mu$ g/ml y n en la **Tabla 11** se proporciona la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD  $\sigma$ ) de 3 donantes diferentes que respondieron (excepto donde se indica). La proporción de IFN $\gamma$  secretado en la muestra tratada con las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 (que comprende una Región Fc de IgG1 humana (AA) o de IgG4 humana (P)) sobre los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B (es decir, anti-PD-1/PD-1 mAb A humanizado y anti-PD-1/PD humanizado -1 mAb B) se presenta en la **Tabla 12** y la **Tabla 13**, respectivamente.

30 **Tabla 11**

$\mu$ g/ml de anticuerpo anti-PD1	Secreción de IFN $\gamma$ (pg/ml)					
	0.625 $\mu$ g/ml	2.5 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	SM	SD $\sigma$	SM
Anticuerpo anti-PD-1	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	221.18	110.89	341.13	247.93	347.46	144.72
PD-1 mAb A IgG4 (P)	281.36	132.65	495.15	190.57	399.41	117.56
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	366.69	196.64	387.682	215.51	387.32	282.81
PD-1 mAb B IgG4 (P)	348.40	185.96	433.382	163.23	551.68	125.08
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	302.05	185.71	610.70	209.77	414.63	272.65
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	384.57 ‡	323.79 ‡	411.40	398.59	370.06	108.12
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)	340.81	207.76	442.598	303.70	655.29	567.91
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)	309.82	130.30	468.62	350.15	424.35	288.95
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	360.00	274.28	373.32	160.25	541.83	444.22
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	275.88	135.23	372.73	53.53	496.70	235.37
Control de IgG	137.14	76.61	100.65	48.67	138.10	120.81
Sin anticuerpo	120.05	73.90	120.05	73.90	109.46	85.18

45 ‡ Resultados de dos donantes que respondieron

50

55

60

65

Tabla 12

		Proporción de secreción de IFNy (nuevo mAb A anti-PD-1/PD-1)					
$\mu\text{g/ml de anticuerpo anti-PD1}$		0.625 $\mu\text{g/ml}$		2.5 $\mu\text{g/ml}$		10 $\mu\text{g/mL}$	
Anticuerpo anti-PD-1		SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$
5	PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
	PD-1 mAb A IgG4 (P)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
	PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1.77	0.92	1.28	0.36	1.07	0.42
	PD-1 mAb B IgG4 (P)	1.23	0.16	0.92	0.27	1.40	0.12
	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	1.36	0.37	2.46	1.85	1.17	0.41
	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1.20+	0.35 ‡	0.79	0.54	0.95	0.22
10	hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)	1.48	0.19	1.46	0.71	1.70	0.84
	hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)	1.13	0.13	0.91	0.42	1.02	0.46
	hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1.50	0.39	1.51	1.23	1.48	0.71
	hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	1.32	0.53	1.48	0.86	1.42	0.12
	Control de IgG	0.63	0.2	0.33	0.08	0.39	0.24
	Sin anticuerpo	0.54	0.12	0.39	0.14	0.31	0.17

‡ Resultados de dos donantes que respondieron

Tabla 13

		Proporción de secreción de IFNy (nuevo mAb B anti-PD-1/PD-1)					
$\mu\text{g/ml de anticuerpo anti-PD1}$		0.625 $\mu\text{g/ml}$		2.5 $\mu\text{g/ml}$		10 $\mu\text{g/ml}$	
Anticuerpo anti-PD-1		SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$
25	PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.37	0.37	0.82	0.20	1.06	0.48
	PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.82	0.12	1.16	0.38	0.72	0.07
	PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1.0	0.00	1.0	0.00	1.0	0.00
	PD-1 mAb B IgG4 (P)	1.0	0.00	1.0	0.00	1.0	0.00
	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	0.84	0.22	1.77	0.81	1.11	0.07
	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	0.91 ‡	0.26 ‡	0.83	0.50	0.68	0.17
30	hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)	1.04	0.59	1.12	0.29	1.60	0.42
	hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)	0.92	0.09	0.99	0.36	0.75	0.39
	hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1.01	0.48	1.07	0.57	1.34	0.15
	hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.78	0.12	1.10	0.38	1.46	0.53
	Control de IgG	0.39	0.08	0.27	0.08	0.34	0.13
	Sin anticuerpo	0.34	0.11	0.31	0.03	0.28	0.08

‡ Resultados de dos donantes que respondieron

40 Los resultados de estos estudios demuestran que los anticuerpos de PD-1 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 mejoraron drásticamente la producción de IFNy (**Figuras 14 y 15A**, y **Tablas 11-13**), y TNF $\alpha$  (**Figura 15B**) de PBMC estimuladas con SEB tras la reestimulación. Además, la combinación de anticuerpos anti-PD-1 con anticuerpos anti-LAG-3 dio como resultado una mejora adicional de la liberación de citoquinas (**Figura 14**) de PBMC estimuladas con SEB tras la reestimulación. En particular, la combinación de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 o PD-1 mAb 15 con el anticuerpo anti-LAG-3 único LAG-3 mAb 1 proporcionó la mayor mejora.

#### Ejemplo 5

#### 50 Estudios de unión de moléculas biespecíficas de PD-1 X LAG-3

55 Se generaron varias moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3, incluyendo diacuerpos que contienen la región Fc que comprenden tres, cuatro y cinco cadenas y un anticuerpo biespecífico. Se generaron cuatro diacuerpos que tienen cuatro cadenas y que comprenden dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K y se les asignó las designaciones "DART A", "DART B", "DART C" y "DART I". Se generaron cuatro diacuerpos que tienen cuatro cadenas y que comprenden los dominios CH1/CL y se les asignaron las designaciones "DART D", "DART E", "DART J" y "DART 1". Se generaron dos diacuerpos que tienen cinco cadenas y que comprenden los dominios promotores de heterodímeros de espiral E/k y dominios CH1/CL y se les asignaron las designaciones "DART F" y "DART G". Se generó un diacuerpo que tiene tres cadenas y que comprende dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K y se le asignó la designación "DART H." Se generó un anticuerpo biespecífico que tiene cuatro cadenas y se le asignó la designación "BSAB A". La estructura y las secuencias de aminoácidos de estas moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 se han proporcionado anteriormente y se resumen en la **Tabla 14** a continuación.

Tabla 14						
	Nombre	MAbs originales	Fc <sup>‡</sup>	Cadenas	SEQ ID NO:	Otros componentes
5	DART A	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG4 (YTE)	4	267 ( $X_1 = A$ ; $X_2 = Y$ ; $X_3 = T$ ; $X_4 = E$ ) y 268	Espirales E/K; ver Figura 3B
10	DART B	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,3)	IgG4 (YTE)	4	267 ( $X_1 = G$ ; $X_2 = Y$ ; $X_3 = T$ ; $X_4 = E$ ) y 268	Espirales E/K; ver Figura 3B
15	DART C	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,3)	IgG4	4	267 ( $X_1 = G$ ; $X_2 = M$ ; $X_3 = S$ ; $X_4 = T$ ) y 268	Espirales E/K; ver Figura 3B
20	DART D	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG4 (YTE)	4	269 y 270	CL/CH1; ver Figura 3C
25	DART E	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG4 (YTE)	4	271 y 272	CL/CH1; ver Figura 3C
30	DART F	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG1 (AA/YTE)	5	273, 274, 275 y 276	Espirales CL/CH1 y E/K; ver Figura 5
35	DART G	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG1 (AA/YTE)	5	277, 278, 279 y 280	Espirales CL/CH1 y E/K; ver Figura 5
40	DART H	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG1 (AA)	3	281, 282 y 283	Espirales E/K; Ver Figura 4A

(continuación)

Tabla 14						
	Nombre	MAbs originales	Fc <sup>‡</sup>	Cadenas	SEQ ID NO:	Otros componentes
45	DART I	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 6 (1,1)	IgG4 (YTE)	4	290 y 291	Espirales E/K; ver Figura 3B
50	DART J	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 6 (1,1)	IgG4 (YTE)	4	292 y 293	CL/CH1; ver Figura 3C
55	DART 1	PD-1 mAb A LAG-3 mAb A	IgG1 (AA)	4	284 y 285	CL/CH1; ver Figura 3C
60	BSAB A	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG1 (AA)	4	286, 287, 288 y 289	mAb con región Fc de ingeniería de carga

‡ Las moléculas que incorporan regiones Fc de IgG4 también incorporan una región bisagra de IgG4 estabilizada.

5 Pueden generarse fácilmente moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 adicionales que comprenden sitios de unión al epítopo de PD-1 y/o LAG-3 alternativos incorporando diferentes dominios VH y VL. De manera similar, pueden generarse moléculas que se unen a un antígeno distinto de LAG-3 incorporando VH y VL que tengan la especificidad deseada.

10 Se examinaron los perfiles de saturación de unión de los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I y DART 1; los anticuerpos anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) y PD-1 mAb A IgG4 (PAG); y los anticuerpos anti-LAG-3: hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG1 (AA) y LAG-3 mAb A IgG1 (AA) esencialmente como se ha descrito anteriormente. Los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 se probaron para determinar la unión de PD-1 y LAG-3, mientras que los anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solo se probaron para determinar la unión a sus antígenos respectivos. Para estos estudios se utilizaron células NSO que expresan PD-1 o LAG-3. Se utilizaron los diacuerpos y los anticuerpos (170,0-0,013  $\mu$ M o 85,0-0,0021  $\mu$ M (diluciones en serie de cuatro veces). Se determinaron los valores de EC50 y EC90 y se presentan en las **Tablas 15-16**. Se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD  $\sigma$ ) cuando se realizaron 2 o más experimentos separados.

Tabla 15						
Molécula	Unión por saturación de PD-1					
	EC50 ( $\mu$ M)		EC90 ( $\mu$ M)			
	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$		
DART A	1.9297	0.4324	9.6027	0.4801		
DART B	1.7640 §		12.2700 §			
DART D	2.2267	0.4140	10.9313	2.6351		
DART E	3.2180	0.5742	23.840	3.2385		
DART F	1.4320 §		14.5800 §			
DART G	1.1488	0.6227	3.4220	2.4600		
DART H	4.5310 §		22.6600 §			
DART I	1.3232	0.4890	7.8135	4.0821		
DART 1	2.1329	1.4850	13.8113	9.0256		
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1.2083	0.8112	3.9340	1.8746		
PD-1 mAb A IgG4 (P)	2.3470	1.2362	22.7770	15.0690		
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	1.0879	0.3958	7.4153	3.0794		
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.6733	0.5464	9.9543	6.6569		
§ resultados de un solo experimento						

Tabla 16						
Molécula	Unión por saturación de LAG-3					
	EC50 ( $\mu$ M)		EC90 ( $\mu$ M)			
	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$		
DART A	0.8402	0.2231	4.4448	2.4770		
DART B	1.0750 §		9.8580 §			
DART D	0.8985	0.5326	5.7967	4.7329		
DART E	0.9250	0.8075	5.6450	5.6809		
DART F	5.0090	0.5770	19.3350	4.7447		
DART G	0.9396	0.3045	8.5507	4.7448		
DART H	2.3840 §		9.7810	4.2412		
DART I	0.5321	0.0547	4.198	3.2188		
DART 1	20.0233	2.1454	115.97	15.2425		
hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P)	1.0057	0.1969	5.1360	4.7904		
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0.5968	0.1376	2.0833	0.3244		
hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG1 (AA)	0.6069	0.3430	3.6373	2.4762		
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0.4523	0.1660	2.0187	0.7035		
§ resultados de un solo experimento						

Los estudios de saturación de la unión demuestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 retienen la unión a PD-1 y tienen perfiles de unión que son similares a los perfiles de unión de los anticuerpos anti-PD-1 originales. De manera similar, los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 retienen la unión a LAG-3 y, con la excepción de DART 1, tienen perfiles de unión que son similares a los perfiles de unión de los anticuerpos anti-LAG-3 originales.

#### Ejemplo 6

##### Estudios de inhibición de moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3

Se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 y BSAB A; y los anticuerpos anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) y PD-1 mAb A IgG4 (P), para bloquear la unión de PD-L1 humana (shPD-L1) y PD-L2 humana (shPD-L2) a PD-1 expresada en la superficie de las células NSO, esencialmente como se ha descrito anteriormente. Los diacuerpos y anticuerpos se utilizaron a 33,75-0,002  $\mu$ M o 107,5-0,0001  $\mu$ M (diluciones en serie de cuatro veces).

Se determinaron los valores de IC50 e IC90 y se presentan en la **Tabla 17**. Se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar ( $SD \sigma$ ) cuando se realizaron 2 o más experimentos separados.

Molécula	Bloqueo de unión sPD-L1/PD-1				Bloqueo de unión sPD-L2/PD-1			
	IC50 (mM)		IC90 (mM)		IC50 (mM)		IC90 (mM)	
	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$
DART A	0.9645	0.1485	5.6312	1.5247	1.6273	0.4285	6.9335	3.9849
DART B	1.1515	0.0007	4.8615	0.2199	2.1150	0.3154	7.9550	0.0933
DART D	1.5548	0.1692	7.8950	2.5135	3.1255	0.5869	9.2973	5.5426
DART E	1.6533	0.3307	7.8470	1.1642	2.9460	0.7736	6.6135	0.0177
DART F	0.5697	0.1729	2.0360	0.1174	0.8389	0.0846	1.7995	0.2171
DART G	1.6013	0.3581	8.1953	1.5708	2.5540	0.7891	7.4810	0.2333
DART H	3.3950	0.1018	18.640	9.5742	6.2065	3.6847	29.395	3.8679
DART I	0.8363	0.1302	5.3115	0.3125	1.286	0.3125	6.2485	1.3951
DART 1	1.7467	0.3097	5.4533	1.0214	2.8355	1.8250	7.2735	3.9831
BSAB A	2.1590	0.3097	11.075	0.8132	4.8775	0.5438	15.580	1.3294
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.5186	0.1668	3.8050	1.2227	1.0425	0.2563	3.4880	0.5459
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.9209	0.3256	4.3023	0.7069	1.3859	0.3882	5.1675	0.2943
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)	0.7320	0.2337	3.2048	1.1479	0.9769	0.2893	2.8437	1.4801
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.0765	0.2393	5.2775	0.9933	1.9510	0.8814	5.0880	1.3831

Los estudios de inhibición de la unión de ligandos demuestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 conservan la capacidad de inhibir la unión de sPD-L1 y sPD-L2 a PD-1 en la superficie celular.

Además, se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 y BSAB A; y los anticuerpos anti-LAG-3: hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG1 (AA) y LAG-3 mAb A IgG1 (AA) para bloquear la unión de LAG-3 humano a MHC clase II nativo en la superficie de las células Daudi. Brevemente, cada molécula biespecífica de PD-1 x LAG-3 y anticuerpo anti-LAG-3 de control se mezcló con una proteína de fusión LAG-3-Fc humana soluble biotinilada (shLAG-3), (a 0,5  $\mu$ g/ml) y se incubaron por separado con células Daudi positivas para MHC II ( $2,5 \times 10^6$  células). La cantidad de LAG-3 que se une a la superficie de las células Daudi se determinó usando un anticuerpo secundario de estreptavidina conjugado con PE mediante análisis FACS. Los diacuerpos y anticuerpos se utilizaron a 27,5-0,026  $\mu$ M (diluciones en serie de dos veces) o 107,5-0,0001  $\mu$ M (diluciones en serie de cuatro veces) o 35-0,002  $\mu$ M (diluciones en serie de cuatro veces).

Se determinaron los valores de IC50 e IC90 y se presentan en la **Tabla 18**. Se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar ( $SD \sigma$ ) cuando se realizaron 2 o más experimentos separados.

Molécula	Bloqueo de unión de shLAG-3/MHC Clase II			
	EC50 (μM)	EC90 (μM)	EC50 (μM)	EC90 (μM)
	SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$
DART A	1.3835	1.6465	8.396102	8.3962
DART B	0.4081	0.1104	3.0645	0.3924
DART D	1.1843	1.1398	8.0041	7.3317
DART E	3.2706	2.9177	28.9683	24.1694
DART F	1.5347	1.2674	10.3920	11.2555
DART G	2.0618	3.3552	11.4422	12.4964
DART H	2.8967	4.9817	17.2533	21.1420
DART I	0.4864	0.1549	2.339	1.1780
DART 1	15.9610	14.0883	87.1486	109.533
BSAB A	0.7101	0.0571	7.2470	1.0706
hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P)	0.4815	0.2176	3.4837	1.7564
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0.7011	0.1900	2.4232	0.3481
hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG1 (AA)	0.3637	0.1409	9.4422	7.9319
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0.5923	0.3407	2.1451	1.1139

5

10

15

20

25

Los estudios de inhibición de unión al ligando demuestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 conservan la capacidad de inhibir la unión de una proteína de fusión shLAG-3-Fc al MHC de clase II en la superficie celular. Con la excepción de DART 1, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 tienen perfiles de inhibición similares a los de los anticuerpos anti-LAG-3 originales.

30

### Ejemplo 7

#### Bloqueo del punto de control PD-1/PD-L1 por moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3

35

Se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 y BSAB A; y los anticuerpos anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) y PD-1 mAb A IgG4 (P), para antagonizar el eje PD-1/PD-L1 (es decir, bloquear la interacción PD-1/PD-L1 y prevenir la regulación negativa de las respuestas de las células T) en un ensayo informador de luciferasa Jurkat-luc2-NFAT/CHO-PD-L1 (usando células CHO/PD-L1 y células Jurkat MNFAT-luc2/PD-1) esencialmente como se ha descrito anteriormente. Los diacuerpos y anticuerpos se utilizaron a 100-0,0065  $\mu$ M (diluciones en serie de cuatro veces) o 100-0,0013  $\mu$ M (diluciones en serie de cinco veces).

40

Se determinaron los valores de IC50 e IC90 y se presentan en la **Tabla 19**. La media de la muestra (SM) y la desviación estándar ( $SD \sigma$ ) se proporcionan cuando se realizaron 2 o más experimentos separados.

45

50

55

60

65

Molécula		Señalización del informador			
		IC50 (μM)		IC90 (μM)	
		SM	SD $\sigma$	SM	SD $\sigma$
5	DART A	0.8804	0.1949	7.9115	1.3232
10	DART B	1.079	0.1535	7.5413	3.1483
15	DART D	1.4044	0.2584	12.0786	3.6616
20	DART E	1.4060	0.1222	13.7867	1.4981
25	DART F	0.3404	0.0103	1.8710	0.481
30	DART G	0.6914	0.0206	4.2090	0.7331
35	DART H	36.6167	20.8078	968.300	811.8471
40	DART I	1.3335	0.3641	12.146	6.8787
45	DART 1	11.8807	3.4905	1048.2000	1508.9992
50	BSAB A	9.7825	1.0288	113.3350	22.2951
55	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	0.6460	0.3035	6.0736	2.5513
60	PD-1 mAb A IgG4 (P)	1.328	0.7439	16.5138	9.7149
65	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	0.5214	0.1541	4.7592	2.1044
70	PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.4514	1.0049	35.7382	40.9858

Los estudios de señalización del informador demuestran que la mayoría de los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 conservan la capacidad de inhibir la unión de sPD-L1 a PD-1 en la superficie celular. Los constructos tetravalentes de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, DART A, DART B, DART D, DART-E, DART F, DART G y DART I fueron los inhibidores más potentes en este ensayo. Se obtuvieron resultados similares para varios de estos constructos biespecíficos examinados en un ensayo informador de PD-L2.

### 30 Ejemplo 8

#### Actividad funcional de moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3

35 Se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 para potenciar la liberación de citoquinas mediante la inhibición del punto de control en PBMC estimuladas con SEB tras la reestimulación esencialmente como se ha descrito anteriormente, excepto donde se indica.

40 En estudios iniciales se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H; y los anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), solos o en combinación para potenciar la liberación de citoquinas a través de la inhibición del punto de control. En estos ensayos, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 y los anticuerpos se usaron a una concentración total de 3,125, 12,5 o 50 nM, y las PBMC se estimularon con 0,2 ng/ml de SEB (los estudios anteriores usaron 0,1 ng/ml). Para estos estudios, cuando se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la mitad de la concentración total (es decir, 1,563, 6,25 o 25 nM). Las **Figuras 16A** y **16B** muestran los perfiles de secreción de IFNy de PBMC estimuladas con SEB de dos donantes respondedores representativos, D: 35644 y D: 59697, respectivamente.

50 Como se ha indicado, no todos los donantes responden a SEB a 0,1 o 0,2 ng/ml. Para mejorar la estimulación con SEB de PBMC de un número más amplio de donantes se usó SEB a una concentración alta de 85 ng/ml, o una concentración media de 0,5 ng/ml en estudios adicionales. A estas concentraciones, la estimulación de SEB es más robusta en más donantes, aunque aún puede observarse la variabilidad de donante a donante.

55 En uno de tales estudios, se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B; el anticuerpo anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P); el anticuerpo anti-LAG-3: LAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P); y la combinación de: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), para potenciar la liberación de citoquinas mediante la inhibición del punto de control. En estos ensayos, se usaron moléculas y anticuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 a una concentración de 0,019, 0,078, 0,3125, 1,25, 5 o 20 nM y las PBMC se estimularon con 85 ng/ml de SEB. Para este ensayo en el que se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporcionó a la concentración indicada y, por lo tanto, la concentración de anticuerpo total es el doble de la concentración usada para cada anticuerpo (es decir, 0,038, 0,156, 0,625, 2,5, 10 o 40 nM). Las **Figuras 17A** y **17B** muestran los perfiles de secreción de IFNy de PBMC estimuladas con SEB de dos donantes representativos, D: 55515 y D: 54024, respectivamente.

60 En otro estudio se examinaron las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART C; el anticuerpo anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P); el anticuerpo anti-LAG-3: LAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P); y la

5 combinación de: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), para potenciar la liberación de citoquinas mediante la inhibición del punto de control. En estos ensayos, se usaron las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 y los anticuerpos a una concentración total de 0,048, 0,195, 0,78, 3,125, 12,5 o 50 nM y las PBMC se estimularon con 0,5 ng/ml de SEB. Para estos estudios, cuando se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la mitad de la concentración total (es decir, 0,024, 0,098, 0,39, 1,563, 6,25 o 25 nM). Las **Figuras 18A** y **18B** muestran los perfiles de secreción de IFNy de PBMC estimuladas con SEB de dos donantes representativos, D: 20990 y D: 54947, respectivamente).

10 En un estudio adicional, se examinó la liberación de la citoquina IL-2. Específicamente, se examinaron las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART D, DART H; los anticuerpos anti-PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P); los anticuerpos anti-LAG-3: LAG-3 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb 1 (1,4) IgG4 (P); y la combinación de: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), y hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) y LAG-3 mAb 1 (1,4) IgG4 (P), para mejorar la liberación de IL-2 a través de la inhibición del punto de control. En estos ensayos, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 y los anticuerpos se usaron a una concentración total de 3,125, 12,5 o 50 nM y las PBMC se estimularon con la concentración alta de 85 ng/ml de SEB. Para estos estudios, cuando se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la mitad de la concentración total (es decir, 1,563, 6,25 o 25 nM). La **Figura 19** muestra el perfil de secreción de IL-2 de PBMC estimuladas con SEB de un donante representativo (D: 54024).

15 20 En estudios adicionales, se examinaron las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART B y DART I; los anticuerpos anti-PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P) y hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P); los anticuerpos anti-LAG-3: LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1 (1,4) IgG4 (P) y hLAG-3 mAb 6 (1,1) IgG4 (P); y las combinaciones de: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) y hLAG-3 mAb 1 (1,4) IgG4 (P), y hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) y hLAG-3 mAb 6 (1,1) IgG4 (P) para potenciar la liberación de citoquinas a través de la inhibición del punto de control. En estos ensayos, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 y los anticuerpos se usaron a una concentración de 0,0061, 0,024, 0,09, 0,39, 1,56, 6,25 o 25 nM y las PBMC se estimularon con 0,5 ng/ml de SEB. Para estos estudios, donde se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la concentración indicada y por tanto la concentración de anticuerpo total es dos veces la concentración usada para cada anticuerpo, es decir, 0,0122, 0,048, 0,18, 0,78, 3,12, 12,5 o 50 nM). La **Figura 20** muestra los perfiles de secreción de IFNy de PBMC estimuladas con SEB de un donante representativo D: 56041).

25 30 35 Se examinó la capacidad de la molécula biespecífica PD-1 x LAG-3 DART I; la combinación del anticuerpo anti-PD-1 PD-1 mAb A IgG4 y el anticuerpo anti-LAG-3 LAG-3 mAb A IgG4 (P); y un anticuerpo de control negativo para mejorar las respuestas de células T específicas de antígeno usando un ensayo de recuperación de toxoide tetánico. En particular, se midió la respuesta de la secreción mejorada de citoquinas específica de antígeno usando toxoide tetánico como antígeno de recuperación en el sistema de ensayo de cocultivo. Brevemente, se aislaron células T de memoria CD4 (0,5-1,0 X 10<sup>5</sup> células/pocillo) usando kits de aislamiento de selección negativa (Miltenyi Biotec, San Diego, CA e Invitrogen, Carlsbad, CA) de sangre periférica humana y se cultivaron durante 5-7 días con monocitos irradiados (0,01-0,05X10<sup>5</sup> células/pocillo, 3500 rads) del mismo donante en presencia o ausencia de 5 µg/ml, el antígeno de memoria del toxoide tetánico (TTd) y la dilución (partiendo de 25 nM) de DART I, PD-1 mAb A IgG4 + LAG-3 mAb A IgG4 (P), o un control de isotipo. En placas paralelas, se midió la proliferación mediante la incorporación de timidina titulada e IL-2 y se midió IFNy usando ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) en los días 5-7. Las **Figuras 21A-D** muestran los perfiles de secreción de IFNy (**Figura 21A, 21C**) e IL-2 (**Figura 21B, 21D**) en el día 7, de dos donantes representativos (D50702 y D54267).

40 45 50 Los resultados de estos estudios demuestran que las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 mejoraron drásticamente la producción de IFNy (**Figuras 16A-16B, 17A-17B, 18A-18B, 20**) e IL-2 (**Figura 19**) de PBMC estimuladas con SEB tras la reestimulación. Además, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 mejoraron drásticamente la producción de IFNy (**Figuras 21A y 21C**) de células T de memoria CD4 estimuladas con toxoide tetánico. En particular, las moléculas biespecíficas tetravalentes PD-1 x LAG-3 proporcionaron una mejora mayor que la combinación de anticuerpos anti-PD-1 con anticuerpos anti-LAG-3.

#### Ejemplo 9

#### 55 Farmacocinética de moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3

60 65 70 Se examinó la farmacocinética de una molécula biespecífica de PD-1 x LAG-3 representativa, DART I y un anticuerpo anti-PD-1 representativo, PD-1 mAb A en monos Cynomolgus. Brevemente, se infundieron dos monos cynomolgus (un macho y una hembra) con una dosis única de DART I (5 mg/kg) o PD-1 mAb A (10 mg/kg) y se monitorizó la concentración en suero de las moléculas a lo largo del tiempo usando un ensayo ELISA tipo sándwich. Brevemente, se recubrieron placas de ensayo maxisorb de 96 pocillos con PD-1 humana soluble (shPD-1), se bloquearon con albúmina de suero bovino, se lavaron e incubaron con estándares de calibración, estándares de control de calidad y muestras de suero diluidas. La cantidad de DART I y PD-1 mAb A capturados se evaluó mediante la adición secuencial de una Fc-biotina secundaria de IgG antihumana de cabra y estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP). La actividad de HRP se detectó usando sustrato TMB. Todas las muestras

se analizaron con un lector de microplacas (SpectraMax M2e, Molecular Device, Sunnyvale, CA) y las señales de OD producidas por los calibradores estándar se usaron en el modelo logístico de cuatro parámetros usando el software SoftMax Pro (Versión 5.4, Molecular Devices). Las concentraciones de PD-1 mAb A o DART I se determinaron a partir de la interpolación de los datos de la señal de OD de las muestras con la ecuación que describe la curva estándar. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para este ensayo se estimó en 9,775 ng/mL.

La **Figura 22** muestra la concentración en suero a lo largo del tiempo, las líneas representan la media de monos machos (símbolos rellenos) y hembras (símbolos abiertos) infundidos con DART I (línea continua, triángulos) o PD-1 mAb A (línea discontinua, círculos). Estos datos demuestran que la farmacocinética de una molécula biespecífica de PD-1 x LAG-3 es comparable a la de un anticuerpo anti-PD-1 en monos cynomolgus.

#### Ejemplo 10

##### Estudio de toxicología de anticuerpos de PD-1 y moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3

Se evaluó el perfil de seguridad de un anticuerpo anti-PD1 representativo, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), y una molécula biespecífica de PD1 x LAG3 representativa, DART I, en un estudio de dosificación no GLP (buenas prácticas de laboratorio) en monos cynomolgus.

En este estudio se evaluó la toxicidad potencial y la toxicocinética del anticuerpo anti-PD-1 (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)), cuando se administra mediante múltiples infusiones intravenosas. Además, también se evaluó la toxicidad potencial y la farmacocinética de la molécula PD-1 x LAG-3 DART (DART I), cuando se administra mediante una única infusión intravenosa. El diseño del estudio se presenta en la **Tabla 20**.

**Tabla 20**

Grupo Nº	Material de prueba	Nivel de dosis (mg/kg)	Días de dosificación	Volumen de la dosis	Dosis (mg/ml)	Nº de animales	
						Machos	Hembras
1	Control	0	1, 8, 15	5	0	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
2A	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
2B	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
3A	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
3B	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
4	DART I	5	1	5	1	1 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Los grupos 1, 2A y 3A se dosificaron comenzando el día 1 y se les practicó la necropsia 72 horas después de su última (tercera) dosis el día 18.

<sup>b</sup> Los grupos 2B y 3B se dosificaron comenzando el día 1 y se les practicó la necropsia 7 días después de su última (tercera) dosis el día 22.

<sup>c</sup> El grupo 4 se dosificó comenzando el día 1 y se siguió durante 28 días después de la administración de la única dosis (hasta el día 29); los animales fueron devueltos luego a la colonia.

En este estudio se evaluaron los siguientes parámetros y criterios de valoración: signos clínicos, peso corporal, consumo de alimentos, temperatura corporal, parámetros de patología clínica (hematología, coagulación y química clínica), bioanálisis y parámetros toxicocinéticos, análisis de anticuerpos antifármacos, citometría de flujo, citoquinas, descubrimientos de la necropsia macroscópicos, peso de los órganos y exámenes histopatológicos.

Todos los animales sobrevivieron hasta la eutanasia programada el día 18 o 22 o la liberación del estudio el día 29. Para hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) no hubo cambios relacionados con el artículo de prueba en los signos clínicos, consumo de alimentos, peso corporal, temperatura corporal, hematología, coagulación o parámetros de química clínica, o descubrimientos de necropsia macroscópicos. En los días 18 y 22, fueron evidentes aumentos en el peso del bazo y un infiltrado linfohistiocítico de leve a moderado dependiente de la dosis de la pulpa roja en animales que recibieron hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) a 1 o 100 mg/kg. En comparación con los linfocitos circundantes, las células linfohistiocíticas tenían un citoplasma pálido y núcleos irregulares. Fueron evidentes figuras mitóticas raras. El infiltrado fue una correlación microscópica para el peso del bazo aumentado.

Los perfiles de concentración en suero-tiempo para animales a los que se les administró hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) muestran el perfil esperado para un anticuerpo en esta especie, con unas pocas excepciones. Las pendientes de las curvas después de la tercera dosis cayeron más bruscamente que después de la primera dosis para dos animales en el grupo de dosis de 1 mg/kg y dos animales en el grupo de dosis de 100 mg/kg, lo que indica la posible aparición de anticuerpos antifármacos (ADA) en los ciclos posteriores. El análisis mostró que 2/4 animales

desarrollaron ADA en el grupo de 1 mg/kg y 1/4 animales desarrollaron ADA en el grupo de 100 mg/kg.

En conclusión, la administración de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) por infusión intravenosa una vez a la semana durante 3 semanas (días 1, 8 y 15) fue bien tolerada en monos cynomolgus a niveles de 1 y 100 mg/kg. Un infiltrado celular linfohistiocítico de leve a moderado dependiente de la dosis de la pulpa roja esplénica estaba presente a 1 y 100 mg/kg de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P).

Para DART I, no hubo cambios relacionados con el artículo de prueba en los signos clínicos, el consumo de alimentos, el peso corporal, la temperatura corporal, la hematología o los parámetros de coagulación. Los cambios relacionados con DART I en los parámetros de la química clínica incluyeron elevaciones transitorias no adversas de la aspartato aminotransferasa (AST) y la lactato deshidrogenasa (LDH) el día 2. El cambio medio de AST fue de 3,2x en los animales de control tratados con vehículo y 7,8x en los niveles previos al estudio, con niveles por encima del intervalo de referencia de control 2. El cambio medio de LDH fue de 2,5x los animales de control tratados con vehículo y 6,9x los niveles previos al estudio. Ambos parámetros volvieron a niveles cercanos al valor de referencia el día 8. En conclusión, la administración única de DART-I por infusión intravenosa fue bien tolerada en monos cynomolgus a un nivel de 5 mg/kg.

#### Ejemplo 11

##### 20 Estudio PK de dosis única con anticuerpos anti-PD-1

Se realizó un estudio farmacocinético de dosis única con criterios de valoración toxicológico seleccionados en monos cynomolgus. En este estudio, se comparó hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) con otros dos mAb anti-PD1 IgG4 (P), κ: PD-1 mAb A IgG4 (P) y PD-1 mAb B IgG4 (P). Cada anticuerpo se administró a 10 mg/kg mediante infusión intravenosa de 1 hora a 2 monos (1 M, IF) y los animales se monitorizaron durante 65 días.

No hubo signos clínicos relacionados con el artículo de prueba, cambios en el peso corporal, consumo de alimentos, citoquinas o inmunofenotipificación asociados con la administración de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) o PD-1 mAb A IgG4 (P). Los datos fueron similares para PD-1 mAb B IgG4 (P) con la excepción de que se observaron elevaciones en IL-5 después de la administración de PD-1 mAb B IgG4 (P).

La unión del anticuerpo **anti-PD-1** a PD-1 en la superficie de las células T se determinó mediante citometría de flujo usando un método de competición en el que la intensidad de fluorescencia media (MFI) de unión de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) marcado con fluorescencia a células T en ausencia (control de PBS) o presencia de un exceso de competidor hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) no marcado) durante el transcurso de tiempo completo de las muestras de sangre recogidas de los monos cynomolgus tratados con 1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG4 (P) o PD-1 mAb B IgG4 (P). Como se muestra en las **Figuras 23A-23C**, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) y PD-1 mAb B IgG4 (P) demostraron unión prolongada a PD-1 en la superficie de células T CD4+ y CD8+ (unión de PD-1 mantenida a ≥ 80% durante 28 días o más) (**Figuras 23A y 23C**, respectivamente) en comparación con PD-1 mAb A IgG4 (P) (la unión de PD-1 se mantiene en ≥80% durante 21 días o menos) (**Figura 23B**). Para cada uno de los anticuerpos anti-PD-1, los datos de unión de PD-1 de células T se correlacionaron con sus concentraciones en suero.

#### Ejemplo 12

##### 45 Estudios de toxicología de dosis repetidas

Para evaluar el perfil de seguridad, toxicocinético y farmacodinámico de las moléculas terapéuticas de la presente divulgación, se administró una molécula ejemplar (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)) a monos cynomolgus y se realizó un estudio de dosificación GLP (Buenas prácticas de laboratorio). En este estudio, cuatro grupos de animales (10 por grupo, 5 machos y 5 hembras) fueron tratados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) o un artículo de control, una vez a la semana por infusión a 3 niveles de dosis. Se evaluó a los animales para detectar cualquier posible toxicidad durante un período de dosificación del fármaco de 4 semanas seguido de monitorización durante un período adicional de 10 semanas sin fármaco. El diseño experimental de este estudio se presenta en la **Tabla 21**. A los animales se les dosificó una vez a la semana mediante una infusión intravenosa de una hora usando una bomba de infusión calibrada los días de estudio 1, 8, 15 y 22. Un macho y una hembra de cada grupo se sacrificaron el día 25, los animales restantes se sacrificaron en el día 95 del estudio. Se evaluaron los efectos de la administración de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) sobre las subpoblaciones de leucocitos en circulación, incluyendo la ocupación de los receptores PD-1 en los linfocitos T. Además, se determinaron los perfiles de anticuerpos anti-fármaco (ADA).

60

65

5	Tabla 21								
	Grupo Nº	Material de prueba <sup>a</sup>	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)	Dosis (mg/ml)	No. de animales <sup>b</sup>		Estudio principal	Estudio de recuperación
						M	F		
10	1	Control	0	5.88	0	3	3	2	2
15	2	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	10	5.88	1.7	3	3	2	2
20	3	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	40	5.88	6.8	3	3	2	2
25	4	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	150	5.88	25.5	3	3	2	2

<sup>a</sup> Se administraron control y hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) semanalmente mediante infusión intravenosa  
<sup>b</sup> Se practicó la necropsia a seis monos (3M/3F) por grupo el día 25, mientras que a los monos restantes del grupo de recuperación (2M/2F) se les practicó la necropsia el día 95

20 Las infusiones intravenosas (IV) una vez a la semana de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) a 0, 10, 40 y 150 mg/kg en monos cynomolgus fueron bien toleradas y todos los animales sobrevivieron a su eutanasia programada en los días 25 o 95. No hubo cambios relacionados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en los signos clínicos, el consumo de alimentos, el peso corporal, los exámenes físicos, oftálmicos y neurológicos, la electrocardiología, la temperatura corporal, la frecuencia respiratoria, la presión arterial y la frecuencia cardíaca, coagulación, química clínica y parámetros del análisis de orina, peso de los órganos o descubrimientos macroscópicos de la necropsia.

30 25 Los cambios relacionados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en los parámetros hematológicos incluyeron disminuciones transitorias en los títulos de linfocitos. Los títulos de linfocitos disminuyeron moderadamente en comparación con el estudio previo (día 1 antes de la dosis) el día 2 (23 horas después de la infusión) en machos y hembras a  $\geq 10$  mg/kg, estadísticamente significativo para machos a 10 y 40 mg/kg y hembras a 40 y 150 mg/kg en comparación con los controles. Los títulos de linfocitos volvieron casi a los niveles previos al estudio el día 8 antes de la dosis, pero disminuyeron levemente para algunos machos y hembras en todos los niveles de dosis (0,47x a 0,68x antes del estudio) el día 9 (23 horas después de la infusión). Los títulos de linfocitos aumentaron antes de la dosificación los días 15 y 22, pero disminuyeron para algunos machos y hembras (0,36x a 0,54x antes del estudio) los días 16 y 23 (23 horas después de la infusión).

40 35 Se observó una disminución transitoria, independiente de la dosis, en las poblaciones de células inmunitarias circulantes, incluyendo leucocitos totales, células T, células B y células NK, 23 horas después del final de la infusión en animales tratados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en comparación con el grupo de control. La mayor magnitud de cambio se observó después de la administración de la primera dosis el día 1; se observaron transitoriamente cambios de menor magnitud después de dosis posteriores en los días 8, 15 o 22. Las poblaciones de células inmunitarias generalmente se recuperaron hasta los valores de referencia o cercanos a ellos a las 72 horas después de la EOI ya lo largo de la fase de recuperación. No se observaron cambios en los monocitos circulantes en los animales tratados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en comparación con el grupo de control.

45 40 La unión máxima de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) a células PD-1+/CD4+ y PD-1+/CD8+ se observó durante la fase de tratamiento con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) del estudio en todas las dosis probadas (10, 40 o 150 mg/kg). En recuperación, los animales que no desarrollaron respuestas de anticuerpos antifármacos (ADA), las concentraciones en suero de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) se mantuvieron por encima de 29 µg/ml y la unión de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) máxima a células T PD-1+/CD4+ y PD-1+/CD8+ se mantuvo durante todo el período de recuperación de 10 semanas. En estos animales, no hubo evidencia de modulación de PD-1 en las células T. En los animales en recuperación que desarrollaron respuestas de ADA, la frecuencia de células T PD-1+ unidas a MGD012 disminuyó hasta los niveles de referencia. Las disminuciones de la unión de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) máxima en células PD-1+/CD4+ y PD-1+/CD8+ de animales positivos para ADA se produjo generalmente cuando las concentraciones en suero aparentes de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) cayeron por debajo de aproximadamente 25 µg/ml. Sin embargo, no se sabe si esta relación de umbral aparente se aplica a los animales negativos para ADA, ya que la presencia de ADA en animales positivos para ADA puede contribuir a bloquear la unión de los anticuerpos PD-1 a PD-1.

60 55 Hubo diferencias mínimas asociadas al sexo en las respuestas farmacocinéticas de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), que fueron lineales en todo el intervalo de dosis evaluado (10 a 150 mg/kg). Para hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) a 10, 40 y 150 mg/kg, la  $C_{\text{máx}}$  media combinada de género fue de 240 µg/ml (0,240 mg/ml), 1078 µg/ml (1,08 mg/ml) y 3938 µg/ml (3,94 mg/ml) y la AUC fue de 47310 h·µg/ml (47,3 h·mg/ml), 205723 h·µg/ml (206 h·mg/ml) y 745681 h·µg/ml (746 h·mg/ml), respectivamente. La depuración media por análisis no compartimental (NCA) del primer ciclo de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) antes de la aparición de ADA, fue de 0,21 ml/h/kg, sustancialmente

menor que la tasa de filtración glomerular de monos cynomolgus, como sería de esperar para una proteína de gran peso molecular. El volumen medio de distribución en estado estacionario por NCA del primer ciclo de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) fue de 68 ml/kg, aproximadamente 1,5 veces el volumen sérico, pero menor que el espacio de agua extracelular. Esto sugiere que hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) se extravasa del compartimento vascular al espacio extracelular del tejido, pero que no todo el espacio extracelular era accesible a esta molécula. El valor medio del tiempo de residencia medio (MRT) por NCA del primer ciclo de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) fue 335 horas o aproximadamente 14 días. La aparición de ADA disminuyó las concentraciones de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en los ciclos 2 a 4. Se observaron evidencias de disminución de las concentraciones en suero de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) después de dosis repetidas de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en 7/10, 4/10 y 3/10 animales en los grupos de dosis de 10, 40 y 150 mg/kg, respectivamente. La presencia de ADA contra hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) se confirmó en 4, 2 y 1 de estos animales en los grupos de dosis de 10, 40 y 150 mg/kg, respectivamente; todos los animales en los que no se confirmó ADA estaban en el grupo de necropsia terminal durante el que las concentraciones en suero de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) probablemente interfirieron con la capacidad de detectar ADA. Por consiguiente, en el análisis TK posterior, cuando una concentración mínima era menor que la concentración mínima anterior, se censuraron los datos de este momento en adelante. A partir del modelo de datos de dos compartimentos en todos los ciclos para los 3 grupos de dosis, excluyendo los puntos que se vieron afectados por la ADA, los valores medios para los parámetros de TK primarios para un modelo de 2 compartimentos fueron 0,22 ml/h/kg para la depuración, 38,5 ml/kg para el volumen de distribución inicial ( $V_i$ ) y 33,8 ml/kg para  $V_2$ , que produjo un volumen de distribución medio en estado estacionario ( $V_{ss}$ ) de 72,3 ml/kg y un MRT de 329 horas. Estos valores fueron consistentes con los parámetros obtenidos de NCA de la primera dosis. En ausencia de ADA, las simulaciones predicen que con la dosificación semanal, se alcanzaría el estado estacionario en monos cynomolgus después de la quinta dosis y el índice de acumulación sería 2,4.

El día 25, había infiltrados de células mononucleares perivasculares multifocales mínimas relacionadas con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en la dermis superficial del sitio de inyección intravenosa en machos a  $\geq 40$  mg/kg y en mujeres a  $\geq 10$  mg/kg y fueron una reacción esperada a la inyección repetida de una proteína extraña (anticuerpo monoclonal). El día 95, no se observaron cambios microscópicos relacionados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), lo que indica la recuperación del cambio relacionado con el artículo de prueba presente en el día 25.

En resumen, los resultados de este estudio indican que la administración de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) por infusión intravenosa una vez a la semana (días 1, 8, 15 y 22) fue clínicamente bien tolerada en monos cynomolgus a niveles de 10, 40 o 150 mg/kg. Los efectos observados se limitaron a disminuciones transitorias de los linfocitos circulantes y cambios mínimos en el sitio de inyección relacionados con la inyección de una proteína extraña. En base a estos resultados, se consideró que el nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) era de 150 mg/kg ( $C_{max}$  media combinada por género de 3,94 mg/ml y AUC de 746 h $\cdot$ mg/ml).

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana que comprende un Dominio de Cadena Pesada Variable y un Dominio de Cadena Ligera Variable, en el que: dicho Dominio de Cadena Pesada Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho Dominio de Cadena Ligera Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153 para su uso en combinación con una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, en la que dichas una o más moléculas adicionales son anticuerpos, para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T de un sujeto que lo necesite.
2. Una o más moléculas que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, en la que dichas una o más moléculas son anticuerpos, para su uso en combinación con un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana que comprende un Dominio de Cadena Pesada Variable y un Dominio de Cadena Ligera Variable, en el que: dicho Dominio de Cadena Pesada Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:147, y dicho Dominio de Cadena Ligera Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, en la estimulación de una respuesta inmunitaria mediada por células T de un sujeto que lo necesite.
3. Una combinación de un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana que comprende un Dominio de Cadena Pesada Variable y un Dominio de Cadena Ligera Variable, donde: dicho Dominio de Cadena Pesada Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho Dominio de Cadena Ligera Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, y una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, en la que dichas una o más moléculas adicionales son anticuerpos, para su uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria mediada por células T de un sujeto que lo necesite.
4. Un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD-1 humana que comprende un Dominio de Cadena Pesada Variable y un Dominio de Cadena Ligera Variable, en el que: dicho Dominio de Cadena Pesada Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho Dominio de Cadena Ligera Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:153 para su uso en combinación con otro agente anticancerígeno, y/o una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno, en el tratamiento del cáncer.
5. Un agente anticancerígeno, y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno, para su uso en combinación con un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana que comprende un Dominio de Cadena Pesada Variable y un Dominio de Cadena Ligera Variable, en el que: dicho Dominio de Cadena Pesada Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho Dominio de Cadena Ligera Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, en el tratamiento del cáncer.
6. Una combinación de un anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana que comprende un Dominio de Cadena Pesada Variable y un Dominio de Cadena Ligera Variable, donde: dicho Dominio de Cadena Pesada Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 147, y dicho Dominio de Cadena Ligera Variable comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153, y un agente anticancerígeno y/o una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno, para su uso en el tratamiento del cáncer.
7. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4, la una o más moléculas que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria para uso según la reivindicación 2, el agente anticancerígeno y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno para uso según la reivindicación 5, o la combinación para uso según la reivindicación 3 o 6, en la que el anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana es un anticuerpo quimérico.
8. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 7, la una o más moléculas que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria según las reivindicaciones 2 o 7, el agente anticancerígeno y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno para uso según la reivindicación 5 o 7, o la combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones 3, 6 y 7, en la que el anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana comprende una región Fc.
9. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana, la una o más moléculas que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, el agente anticancerígeno y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno, o la combinación, para su uso según la reivindicación 8, en el que:
- (a) dicha región Fc es de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4;
- (b) dicho anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana comprende además un dominio bisagra; y/o

- (c) dicha Región Fc y dicho Dominio Bisagra son del isotipo IgG4, y en el que dicho Dominio Bisagra comprende una mutación estabilizadora.
- 5 10. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana, la una o más moléculas que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, el agente anticancerígeno y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno, o la combinación, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que:
- 10 (a) el anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana comprende las SEQ ID NO: 264 y 265; o
- 10 (b) el anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana comprende las SEQ ID NO: 264 y 266.
- 15 11. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana, la una o más moléculas que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria, el agente anticancerígeno y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno, o la combinación, para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que dicha región Fc es una región Fc variante que comprende:
- 20 (a) una o más modificaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la variante de la región Fc por un FcγR; y/o
- 20 (b) una o más modificaciones de aminoácidos que aumenten la semivida sérica de la variante de la región Fc; opcionalmente en el que:
- 25 (i) dichas modificaciones que reducen la afinidad de la región Fc variante por un FcγR comprenden la sustitución de L234A; L235A; o L234A y L235A, donde dicha numeración es la del índice UE como en Kabat; y/o
- 25 (ii) dichas modificaciones que aumentan la semivida sérica de la variante de la región Fc comprenden la sustitución de M252Y; M252Y y S254T; M252Y y T256E; M252Y, S254T y T256E; o K288D y H435K, siendo dicha numeración la del índice UE como en Kabat.
- 30 12. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, y 7-11, la una o más moléculas que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria para uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 7-11, o la combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 y 7-11, en donde dicha una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria son un anticuerpo anti-CD137, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-TIGIT, y/o un anticuerpo anti-TIM-3.
- 35 13. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 4, y 7-11, el agente anticancerígeno y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno cancerígeno para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 y 7-11, o la combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en la que dicho antígeno canceroso es 5T4, B7H3, CD19, CD20, CD51, CD123, DR5, EGFR, EpCam, GD2, gpA33, HER2, ROR-1, TAG-72, VEGF-A, y/o VEGFR2.
- 40 14. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4, 7-11 y 13, el agente anticanceroso y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un antígeno canceroso para uso según cualquiera de las reivindicaciones 5, 7-11 y 13, o la combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-11 y 13, en el que dicho cáncer se caracteriza por la presencia de una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste en una célula de: un tumor de la glándula suprarrenal, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, tumores del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello uterino, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de células renales cromófobas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ossium de fibrogénesis imperfecta, una displasia fibrosa de hueso, un cáncer de vesícula biliar o de vías biliares, un cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina nerviosa periférica, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un rhabdomisarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejidos blandos, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides y un cáncer de útero.
- 55 15. El anticuerpo monoclonal monoespecífico de unión a anti-PD1 humana para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4, 6-11 y 13, el agente anticanceroso y/o una o más moléculas que se unen específicamente a un

antígeno canceroso para uso según cualquiera de las reivindicaciones 5, 7-11 y 13, o la combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones 6-11 y 13, en el que dicho cáncer es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de recto, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda B (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), linfomas no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica o linfoma de Burkitt.

10

15

20

25

30

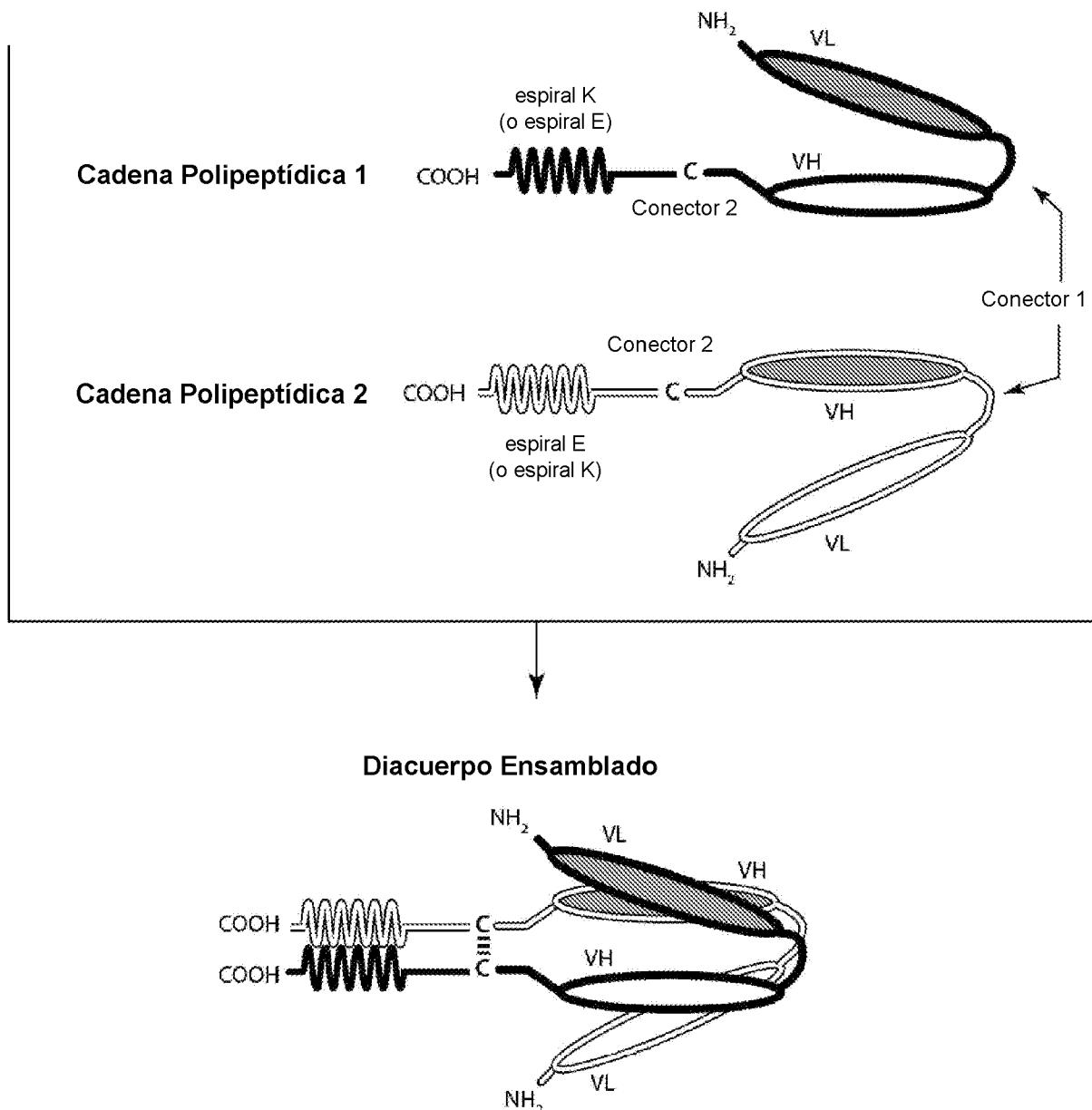
35

40

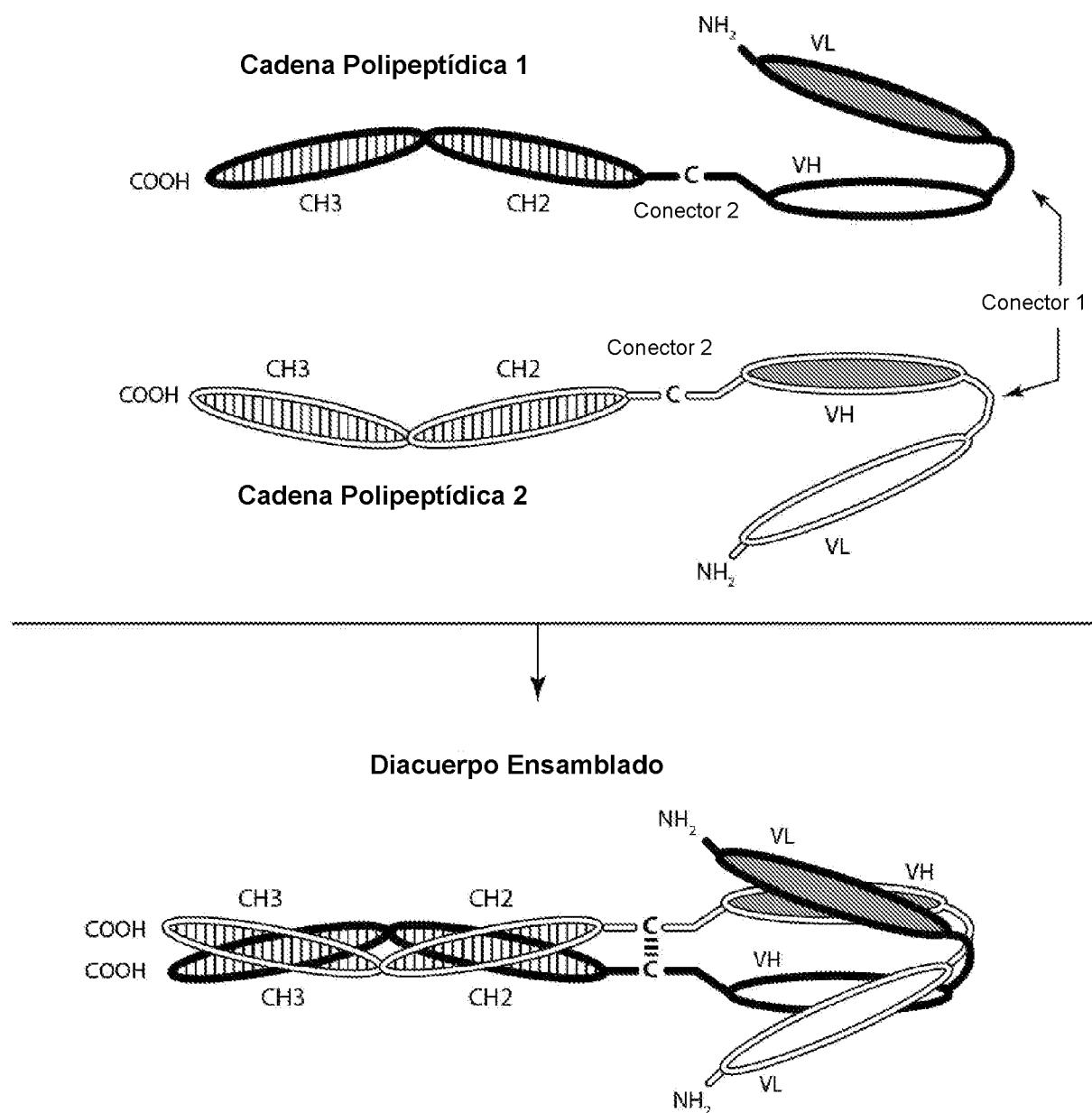
45

50

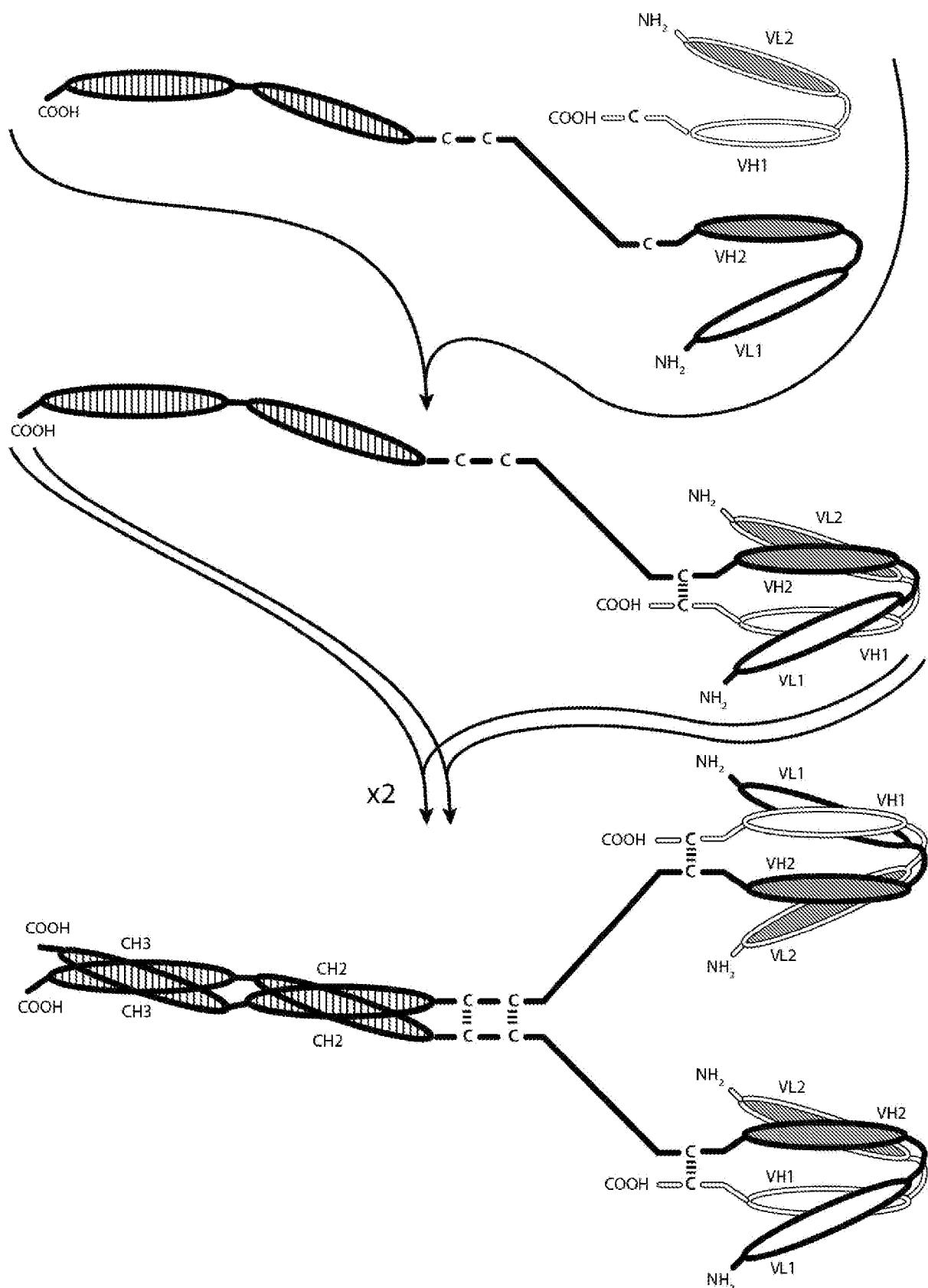
55

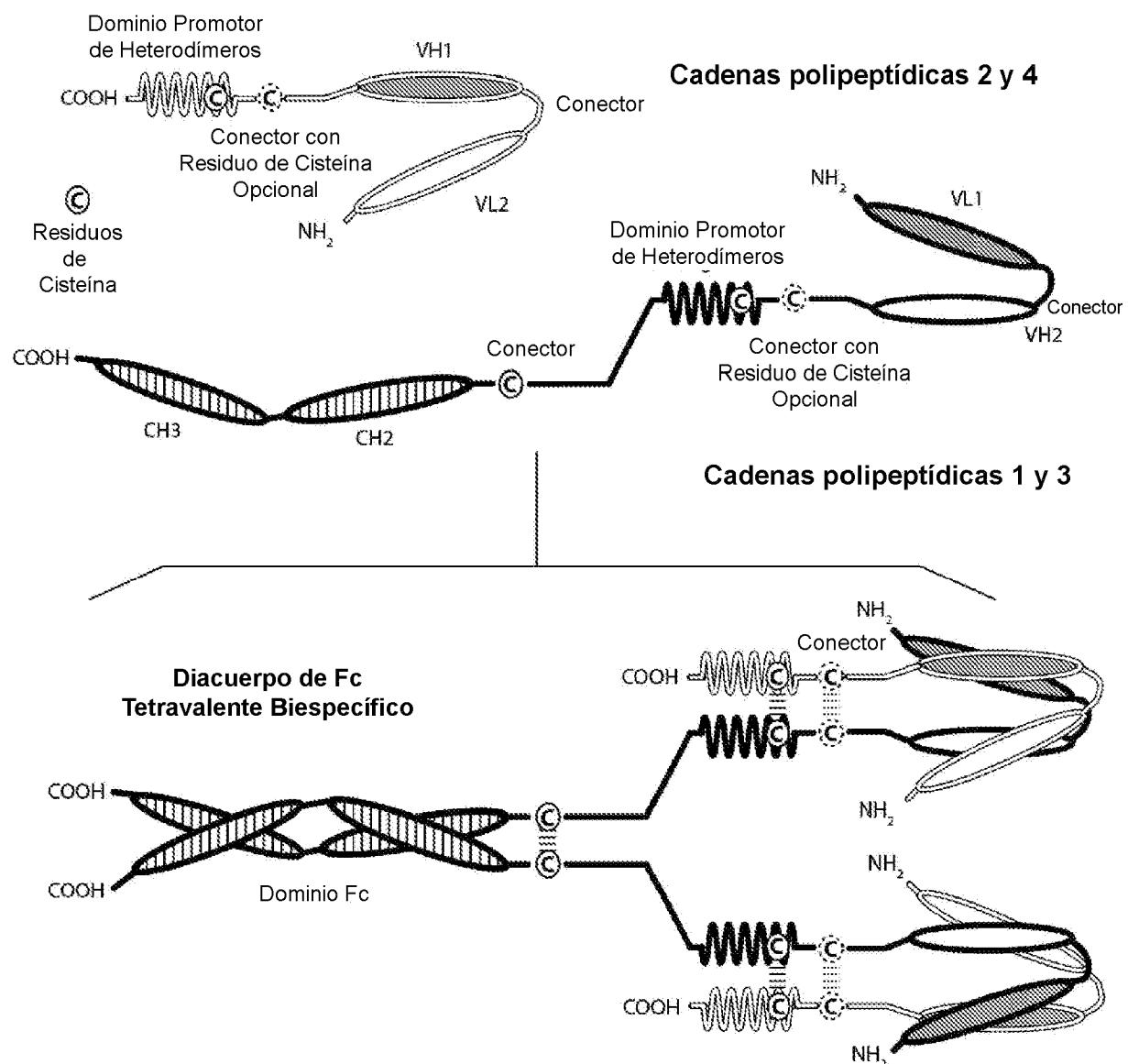


**Figura 1**

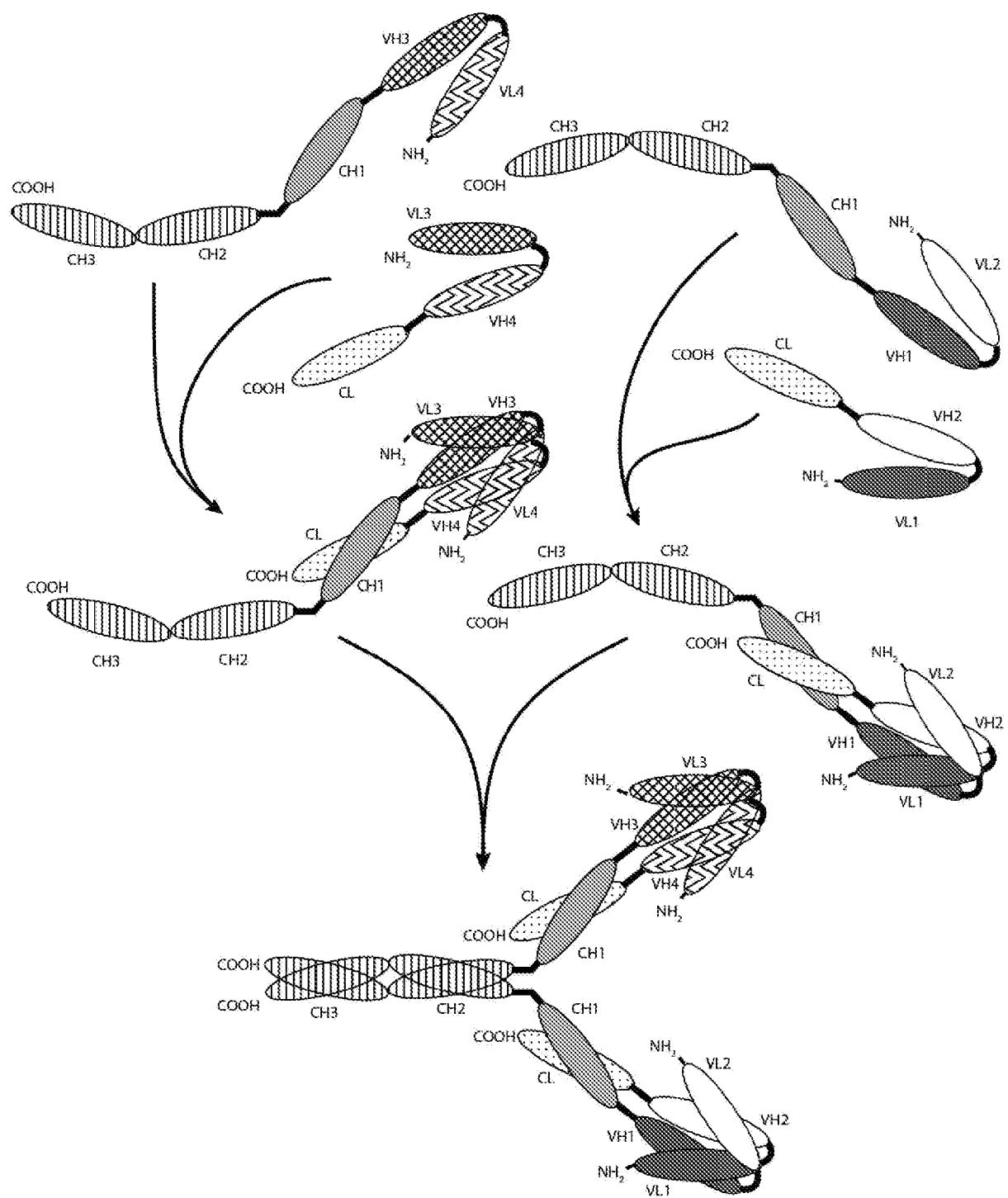


**Figura 2**

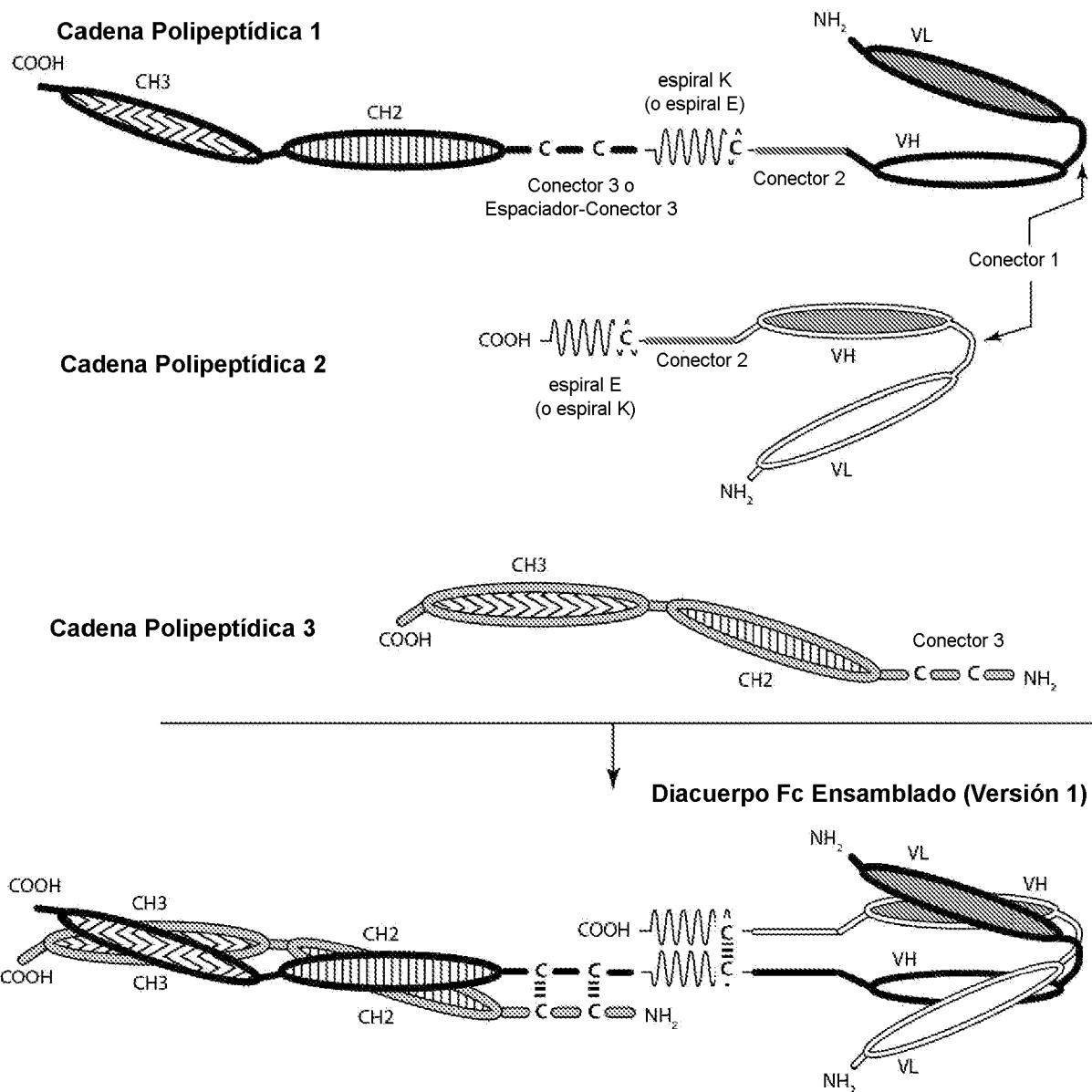
**Figura 3A**

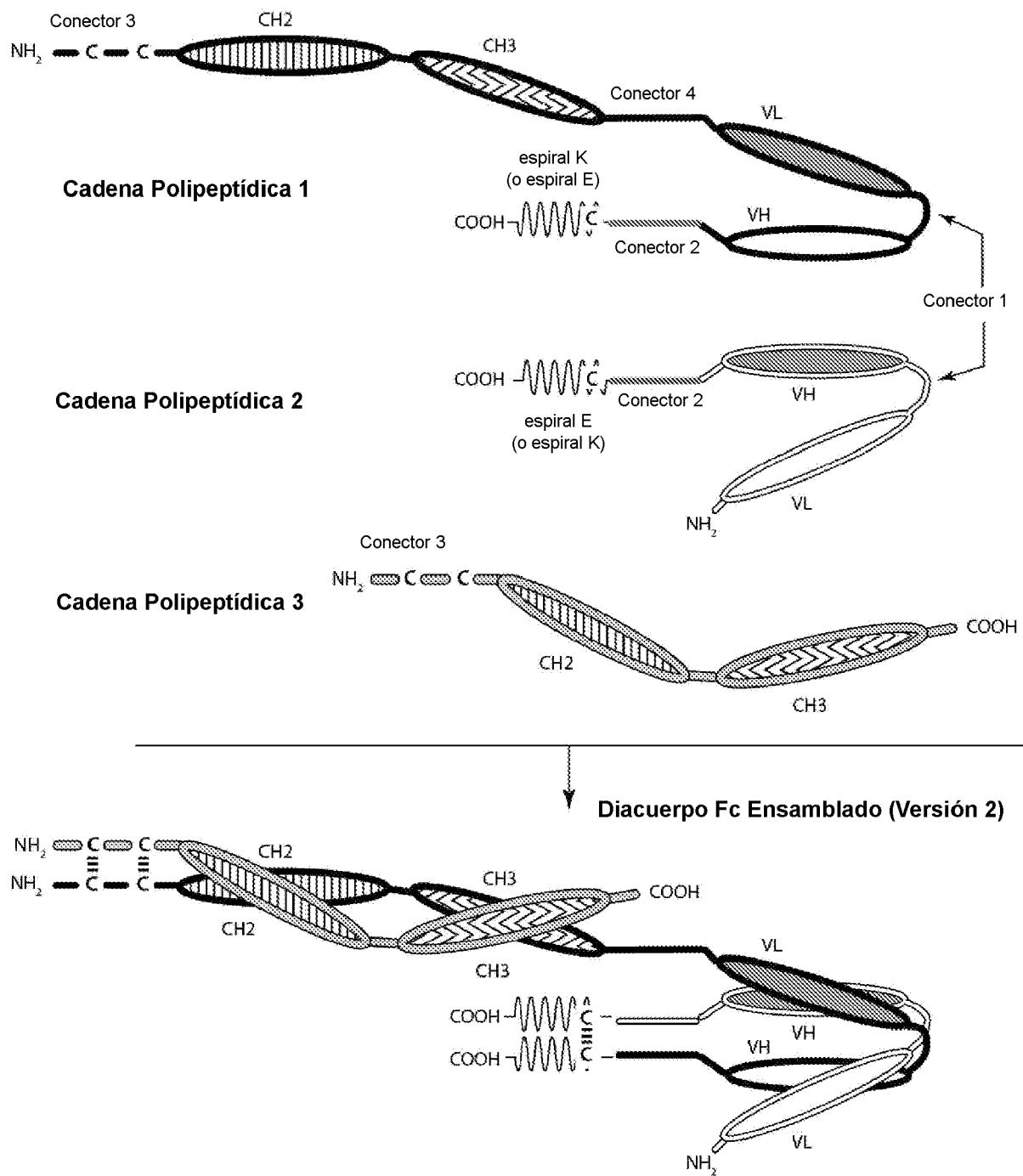


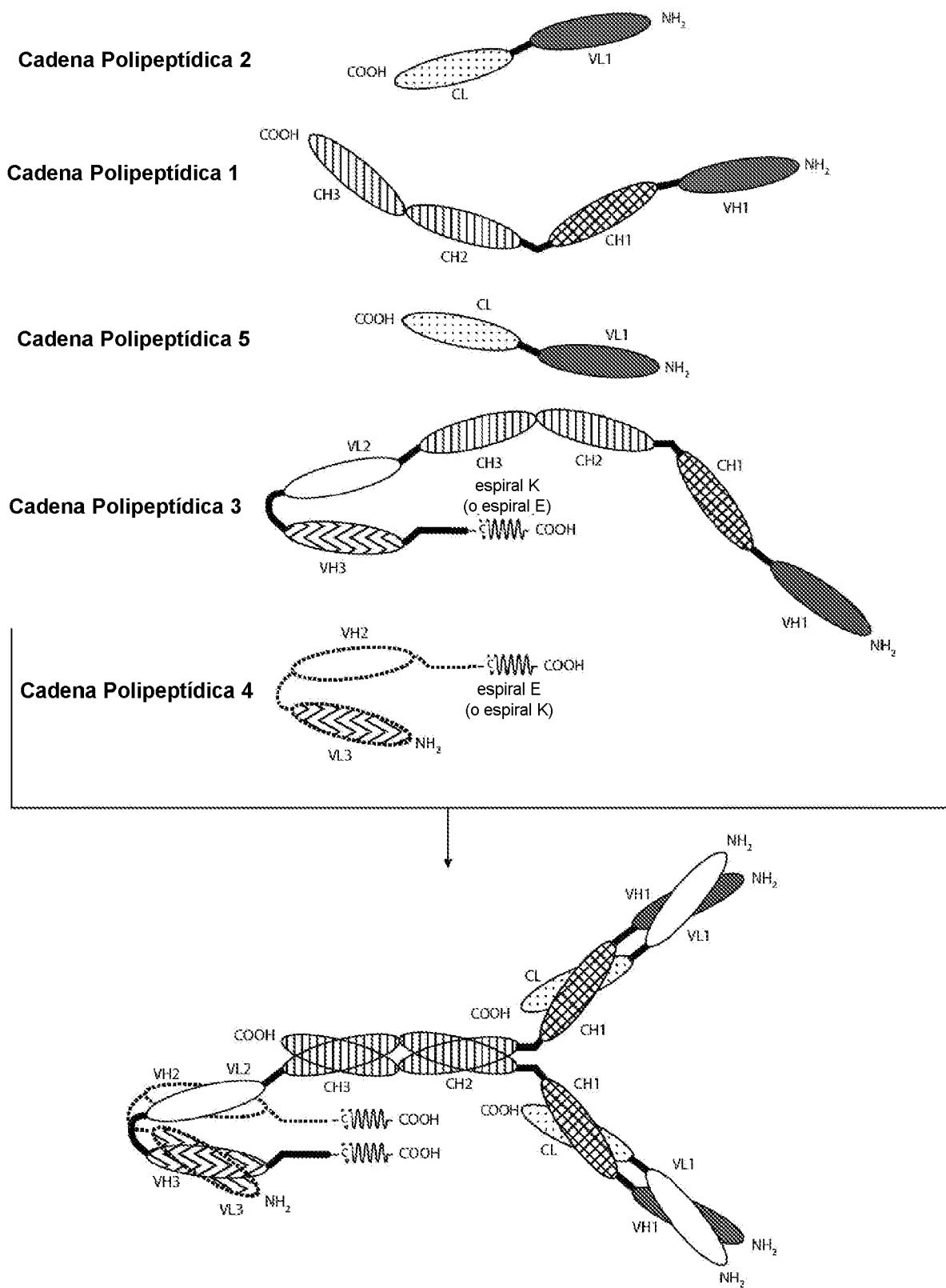
**Figura 3B**

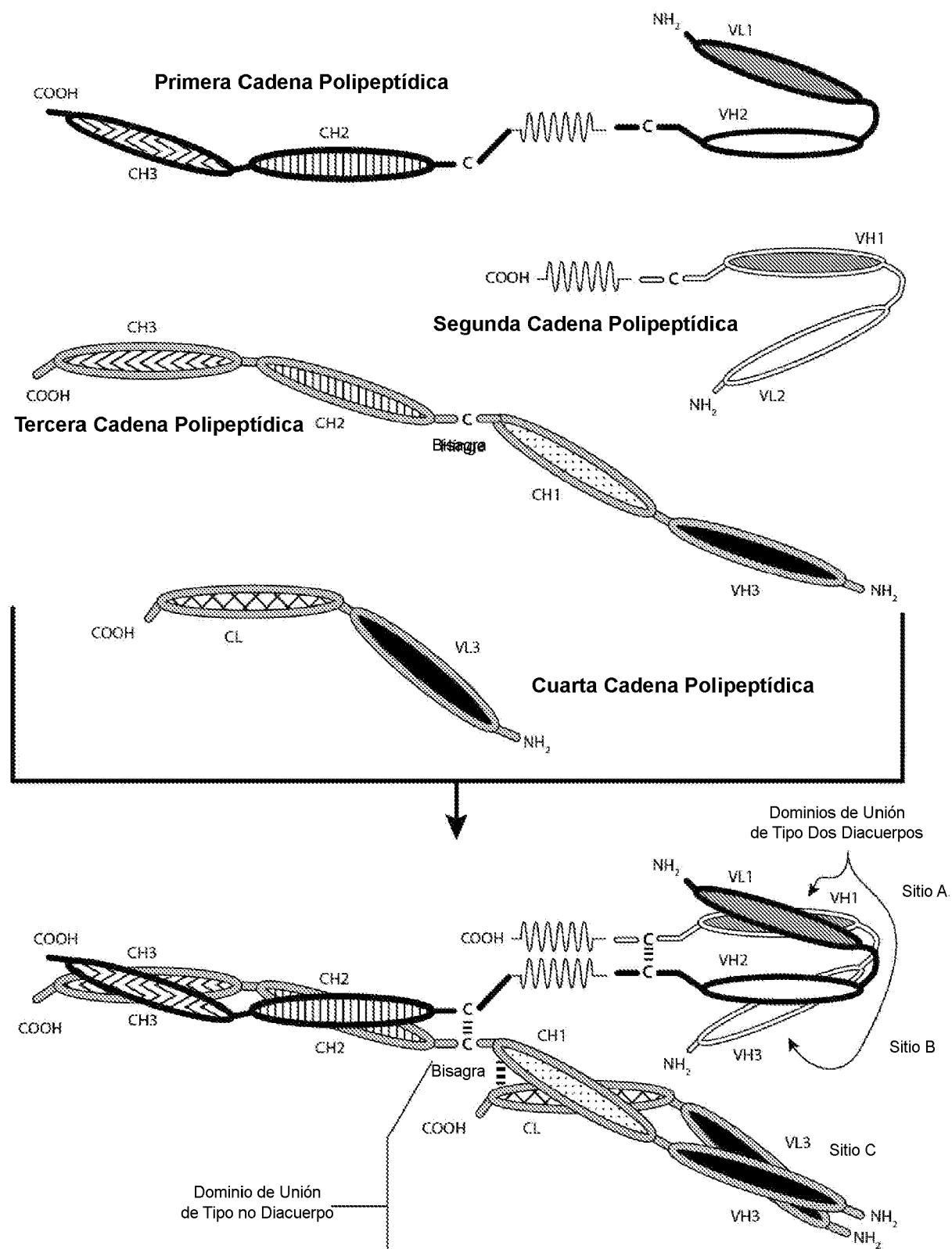


**Figura 3C**

**Figura 4A**

**Figura 4B**

**Figura 5**

**Figura 6A**

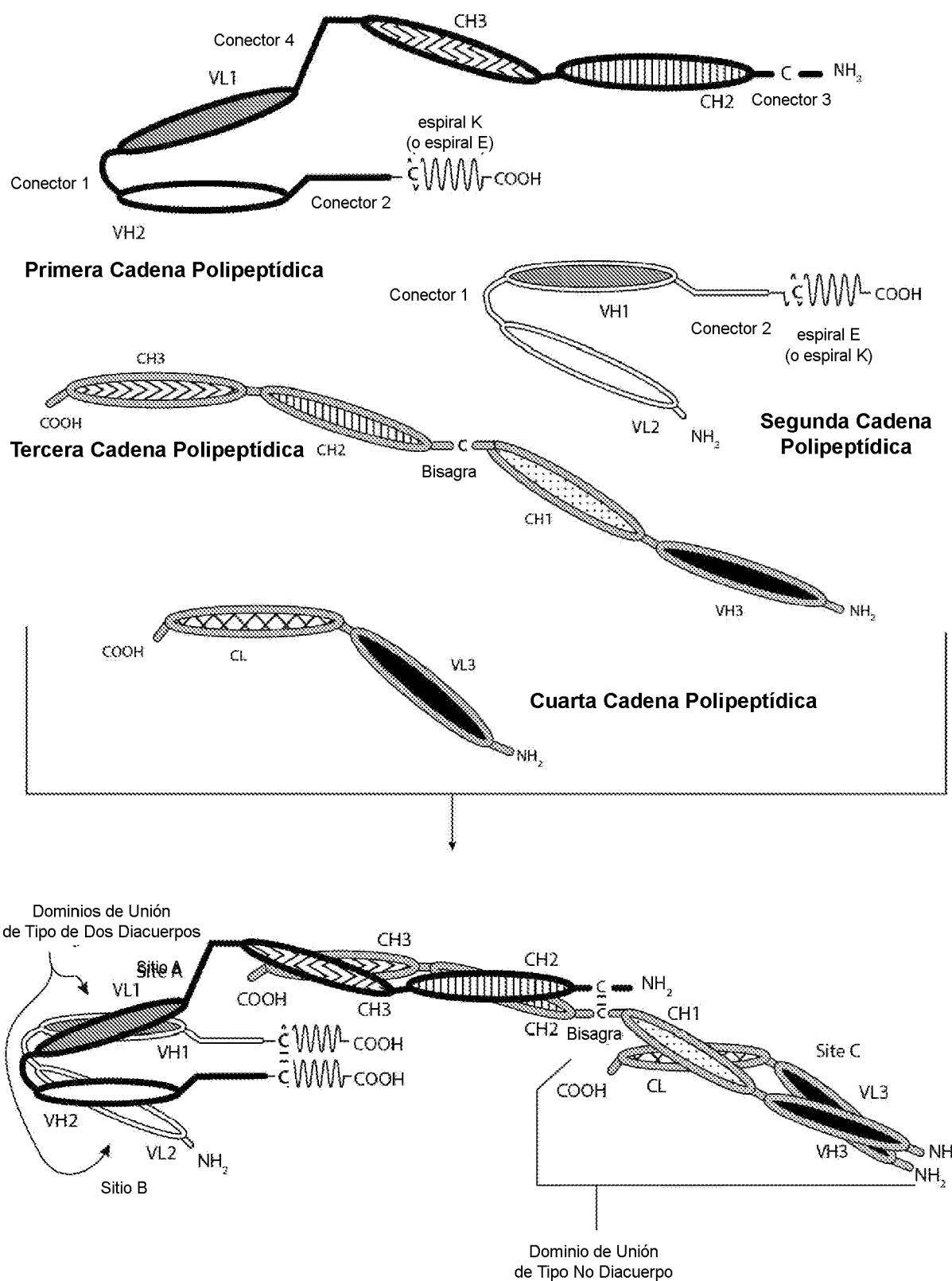
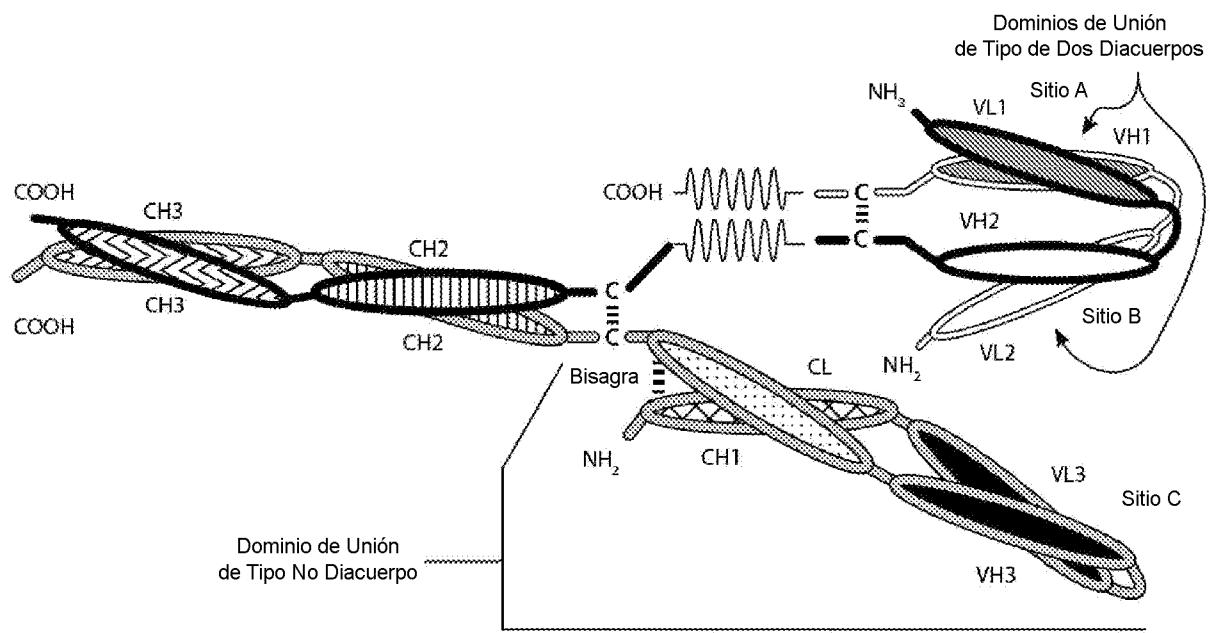
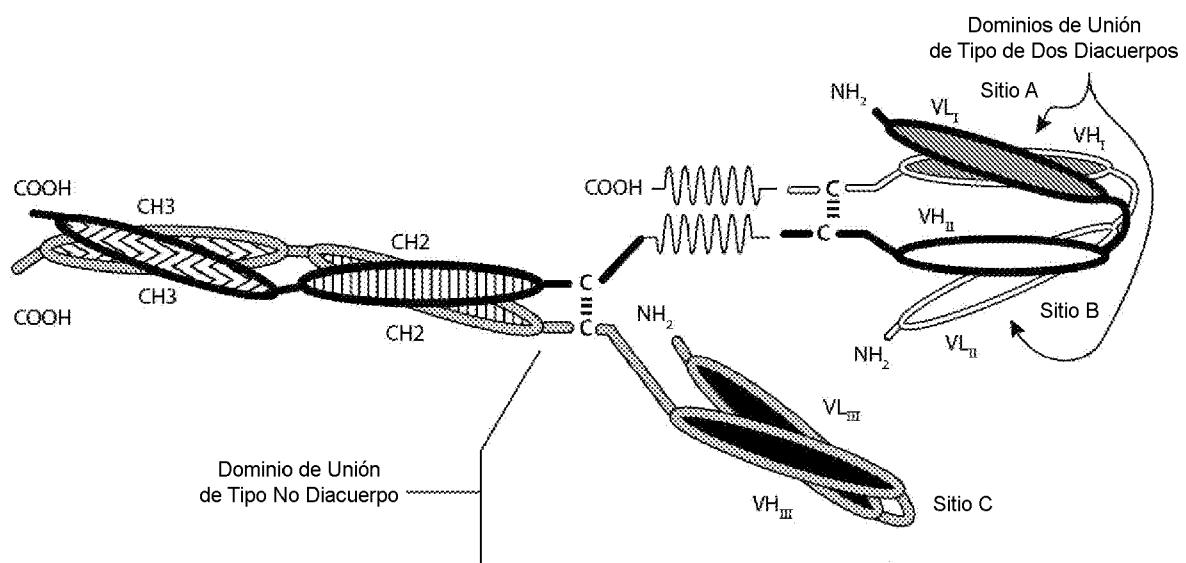


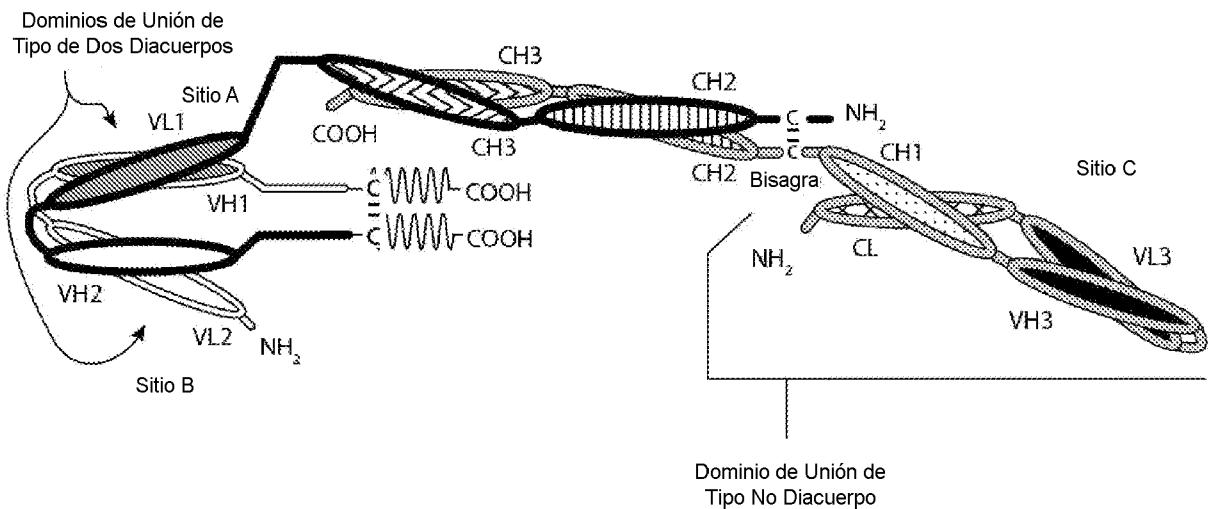
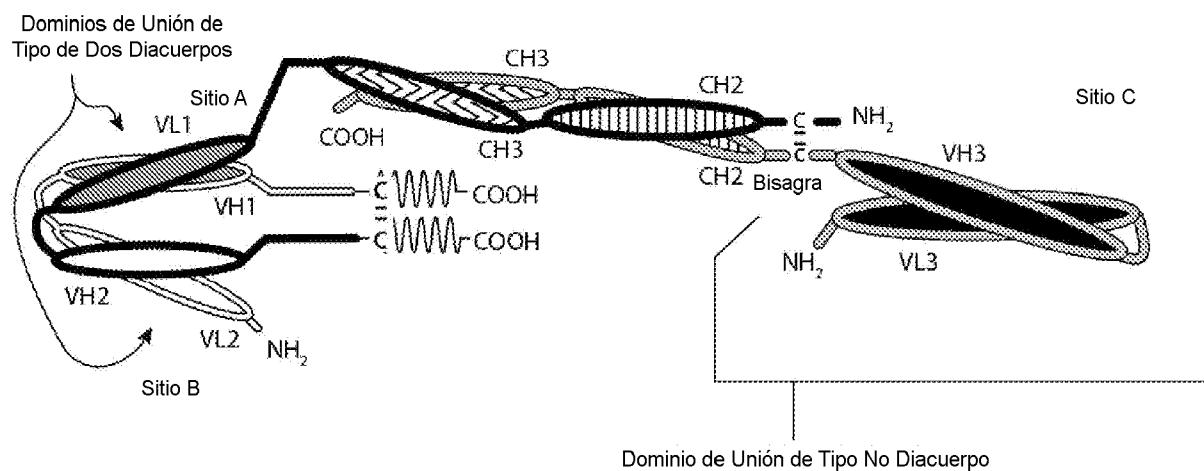
Figura 6B



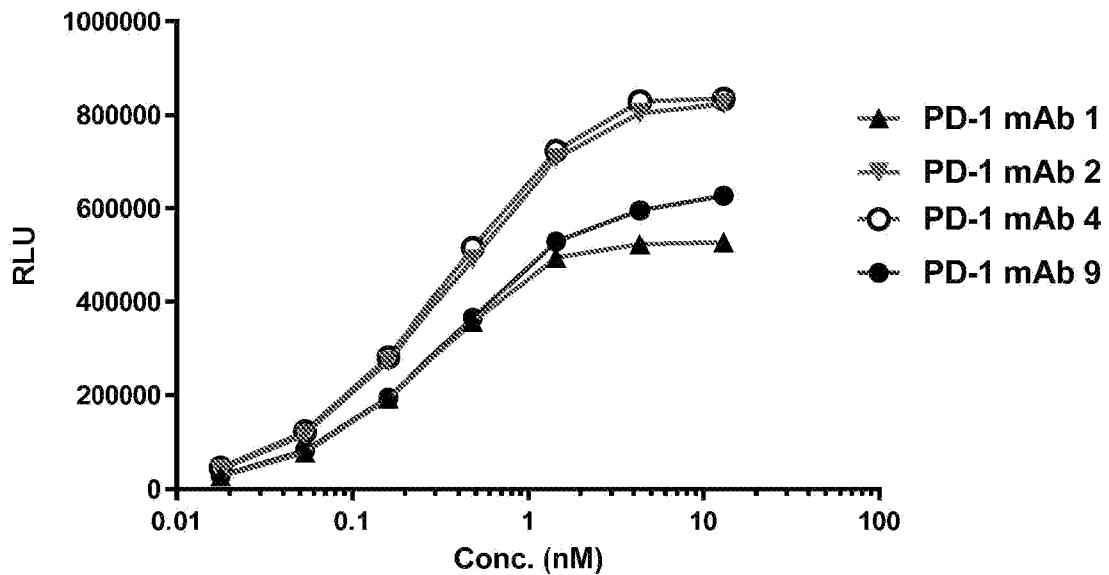
**Figura 6C**



**Figura 6D**

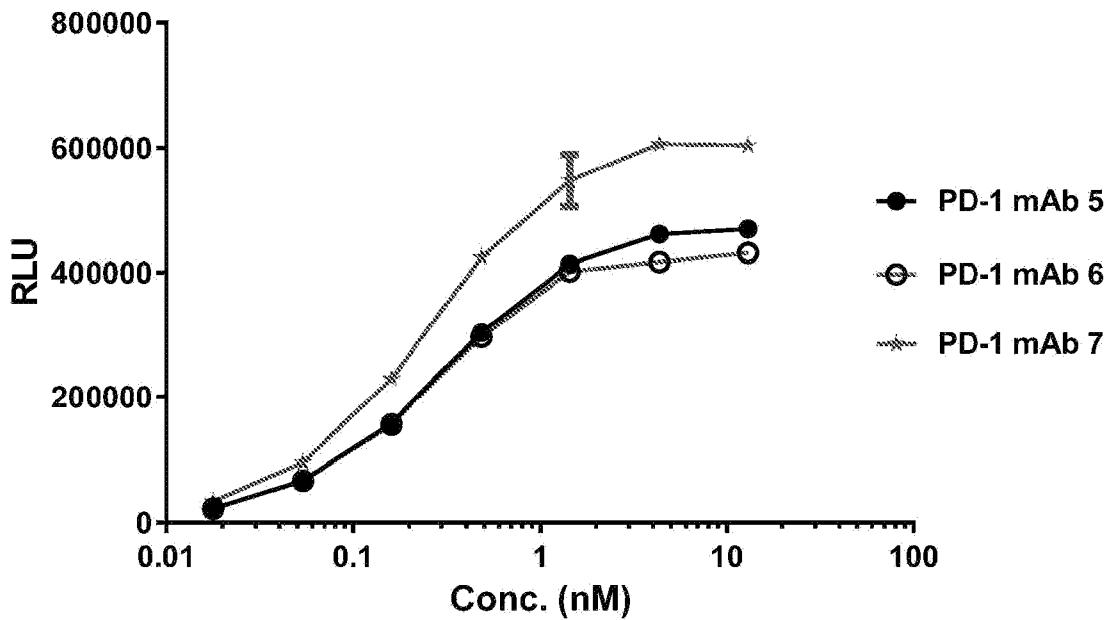
**Figura 6E****Figura 6F**

**shPD-1 His (1ug/ml) recubierto y G anti M H+L HRP detectado**



**Figura 7A**

**shPD-1 His (0,5ug/ml) recubierto y G anti M H+L HRP detectado**



**Figura 7B**

## shPD-1 His (0,5ug/ml) recubierto y G anti mIgG (H+L) detectado

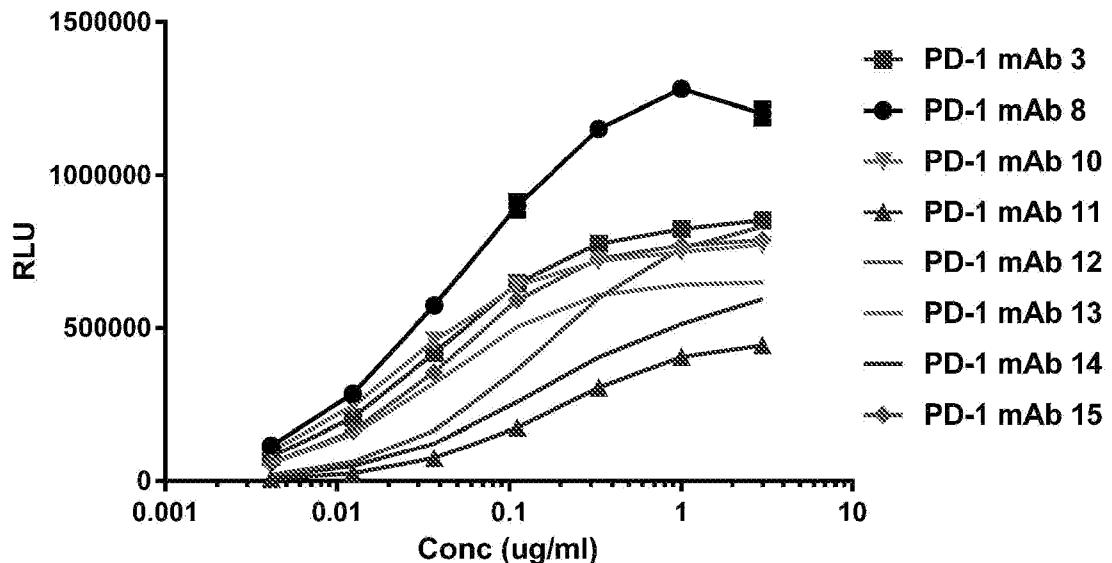


Figura 7C

## shPD-1 hFc (0,5ug/ml) recubierto y G anti mIgG (H+L) detectado

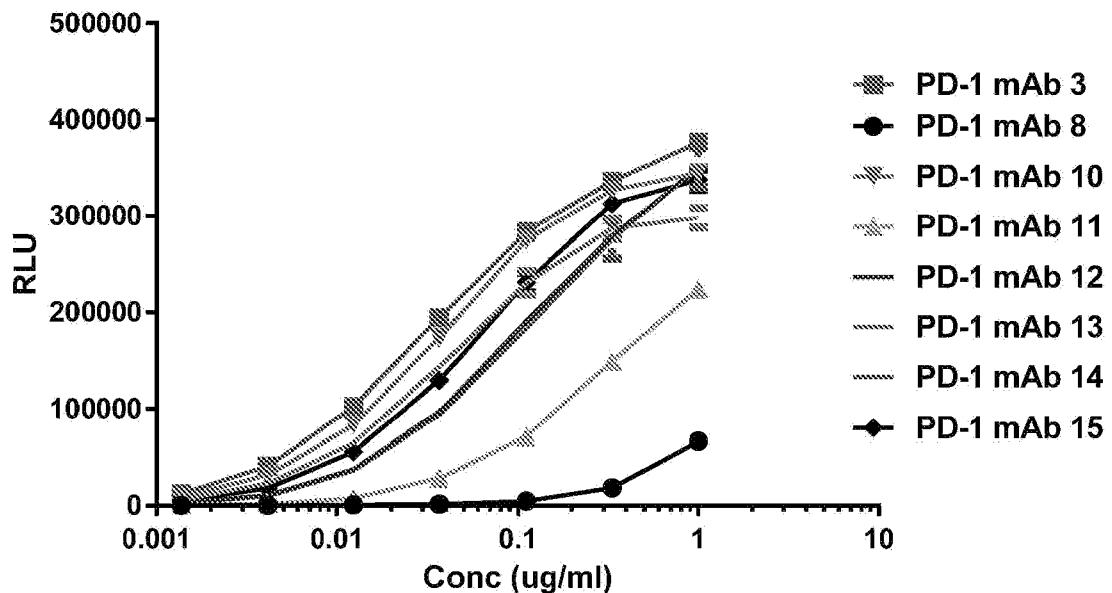


Figura 7D

scino-PD-1-TEV-Fc (0,5ug/ml) recubierto y G anti M H+L HRP detectado

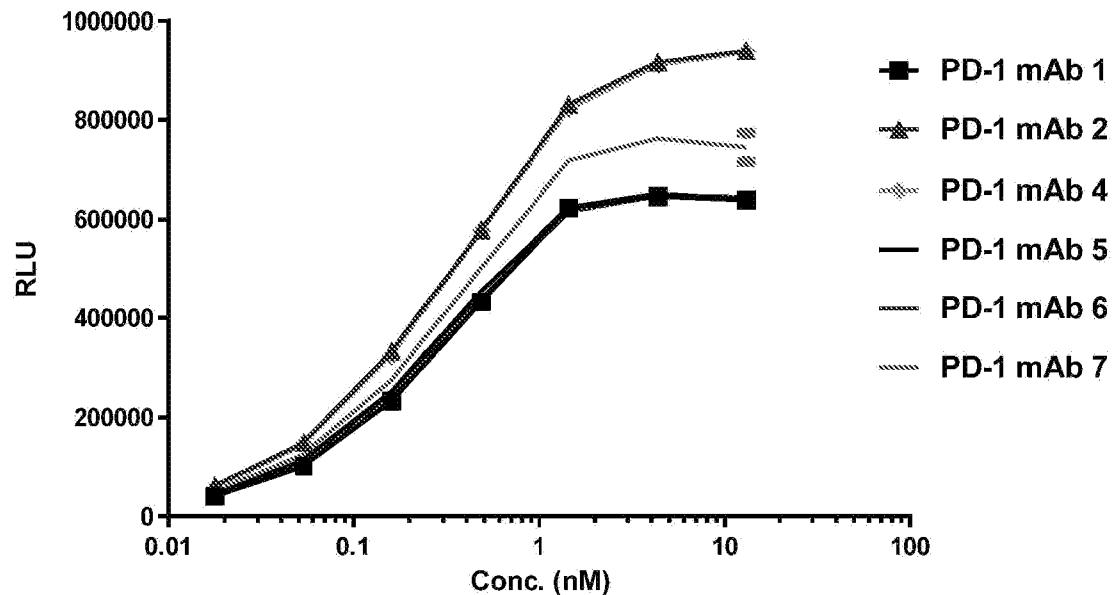


Figura 8A

scino-PD-1-TEC-hFc(1ug/ml) recubierto y G anti M (H+L) detectado

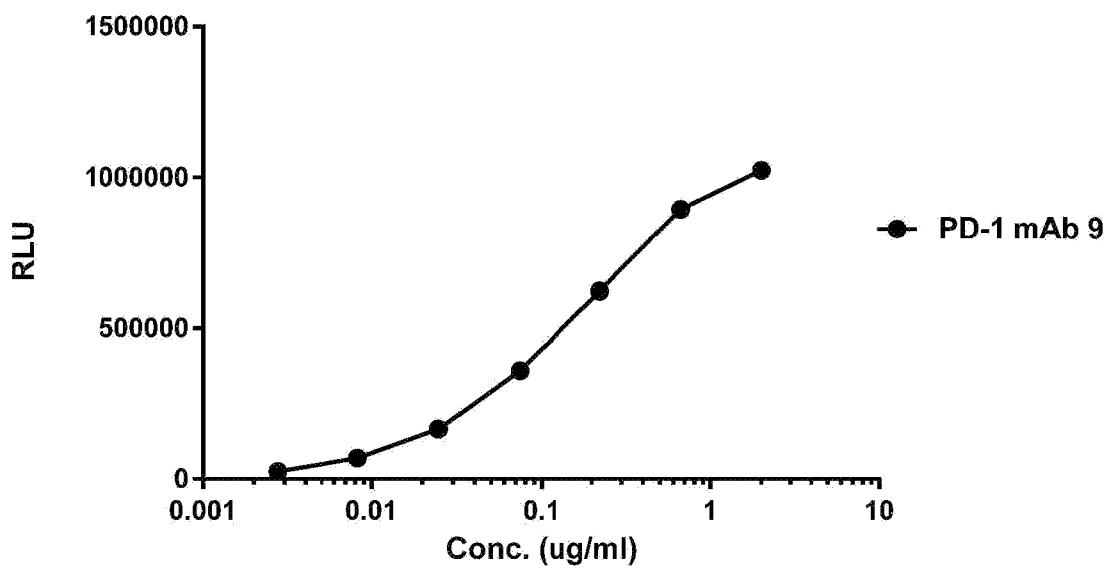
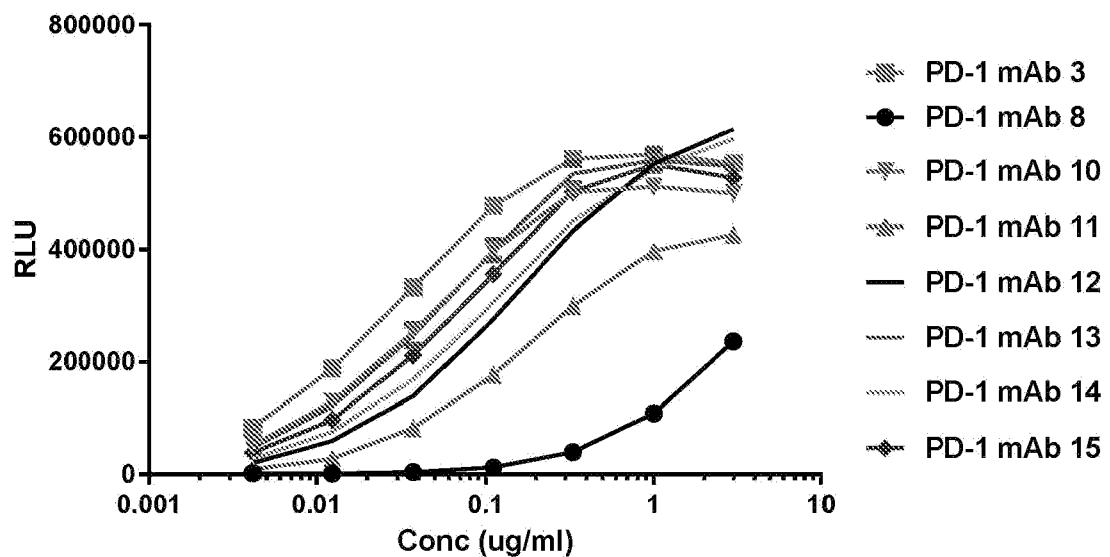


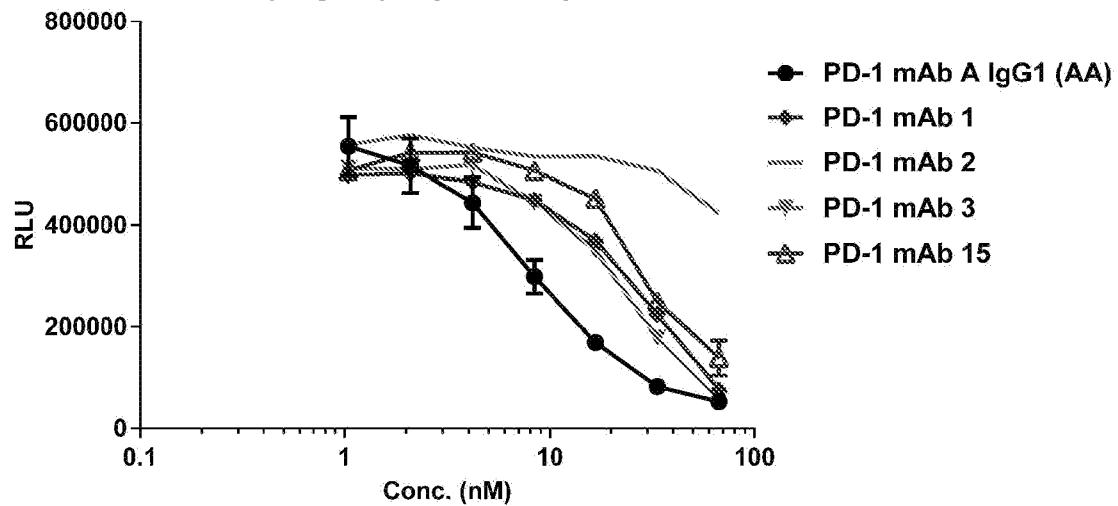
Figura 8B

scino-PD-1-TEV-Fc (1ug/ml) recubierto y G anti mIgG (H+L) detectado



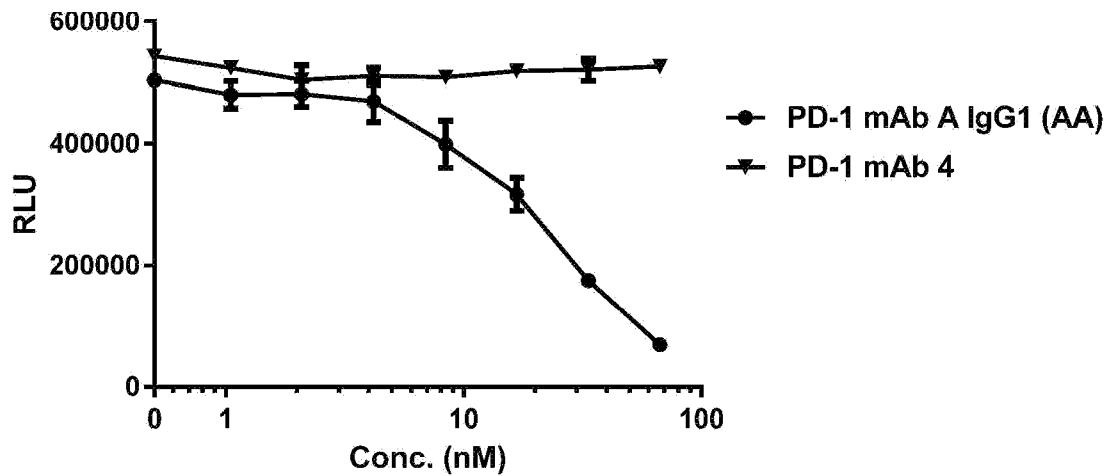
**Figura 8C**

**PD-L1 Fc-biotina (1ug/ml) capturado y shPD-1 His detectado**



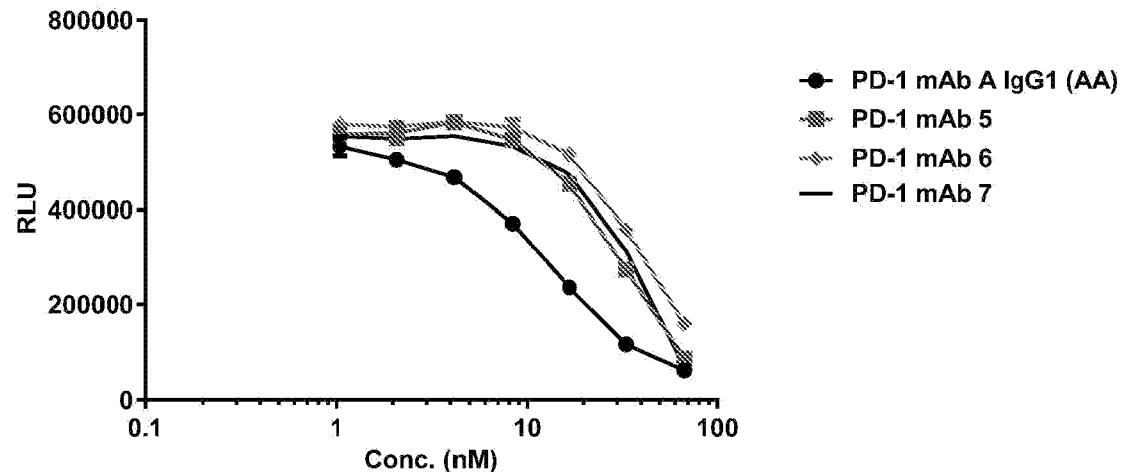
**Figura 9A**

**PD-L1 Fc-biotina (1ug/ml) capturado y shPD-1 His detectado**



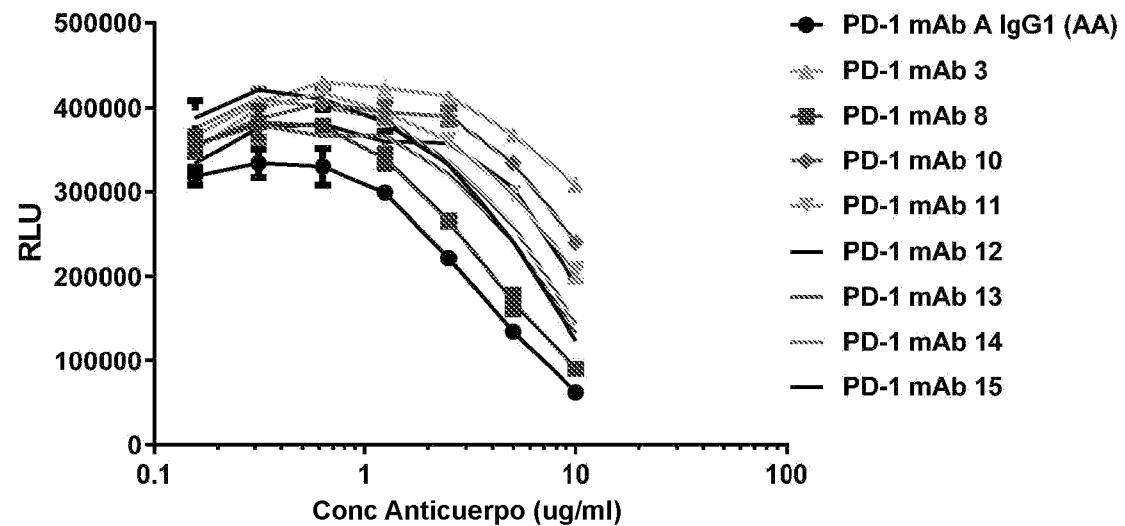
**Figura 9B**

**PD-L1 Fc-biotina (1ug/ml) capturado y shPD-1 His detectado**

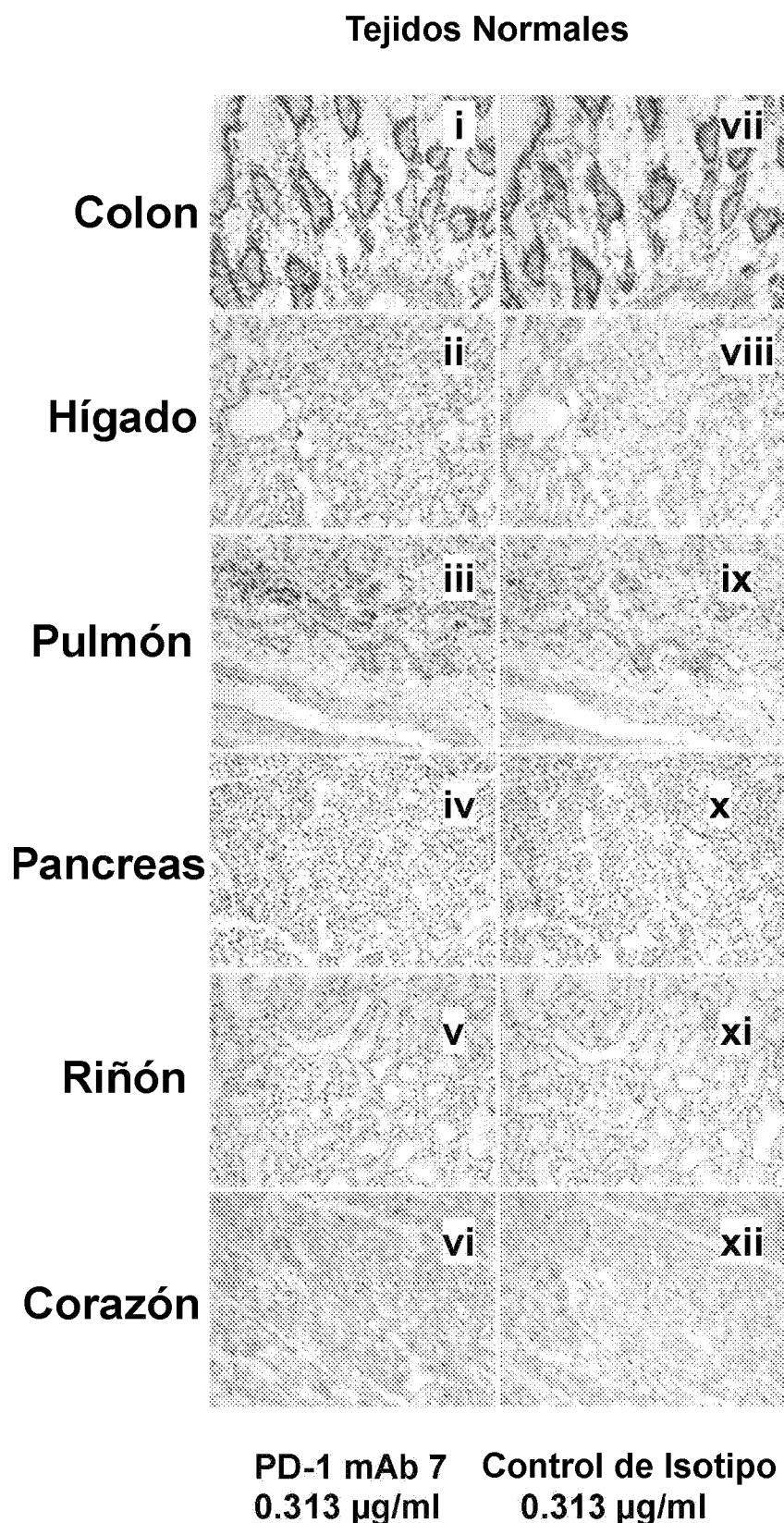


**Figura 9C**

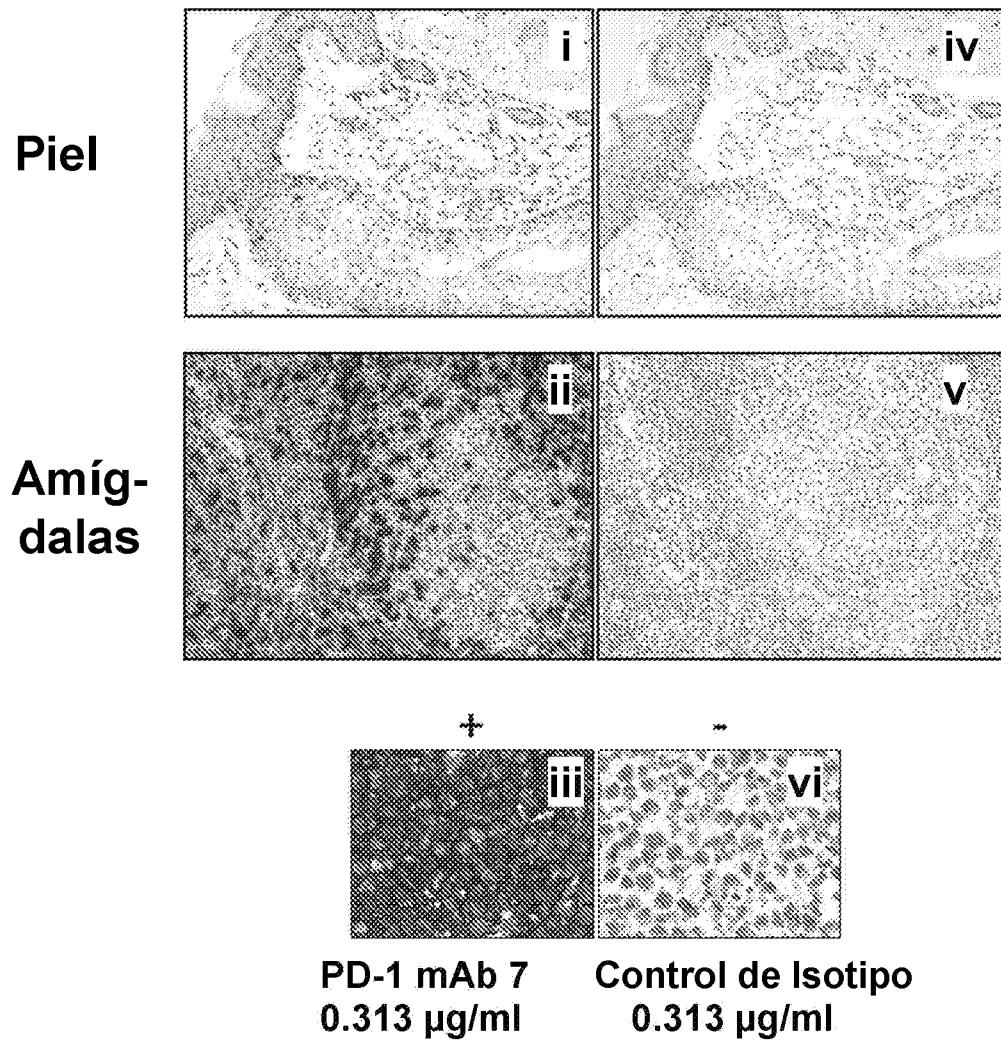
**PD-L1 Fc-biotina (1ug/ml) capturado y shPD-1 His detectado**



**Figura 9D**

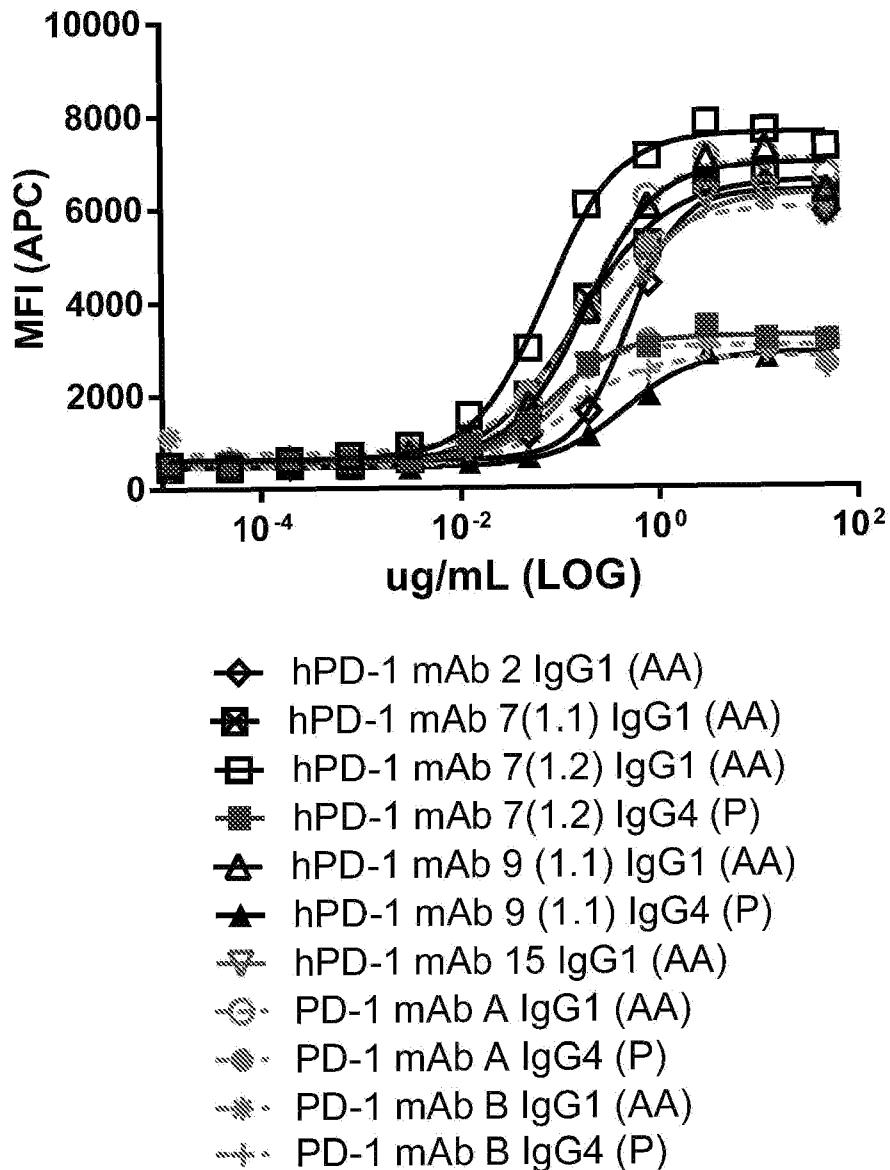


**Figura 10A**



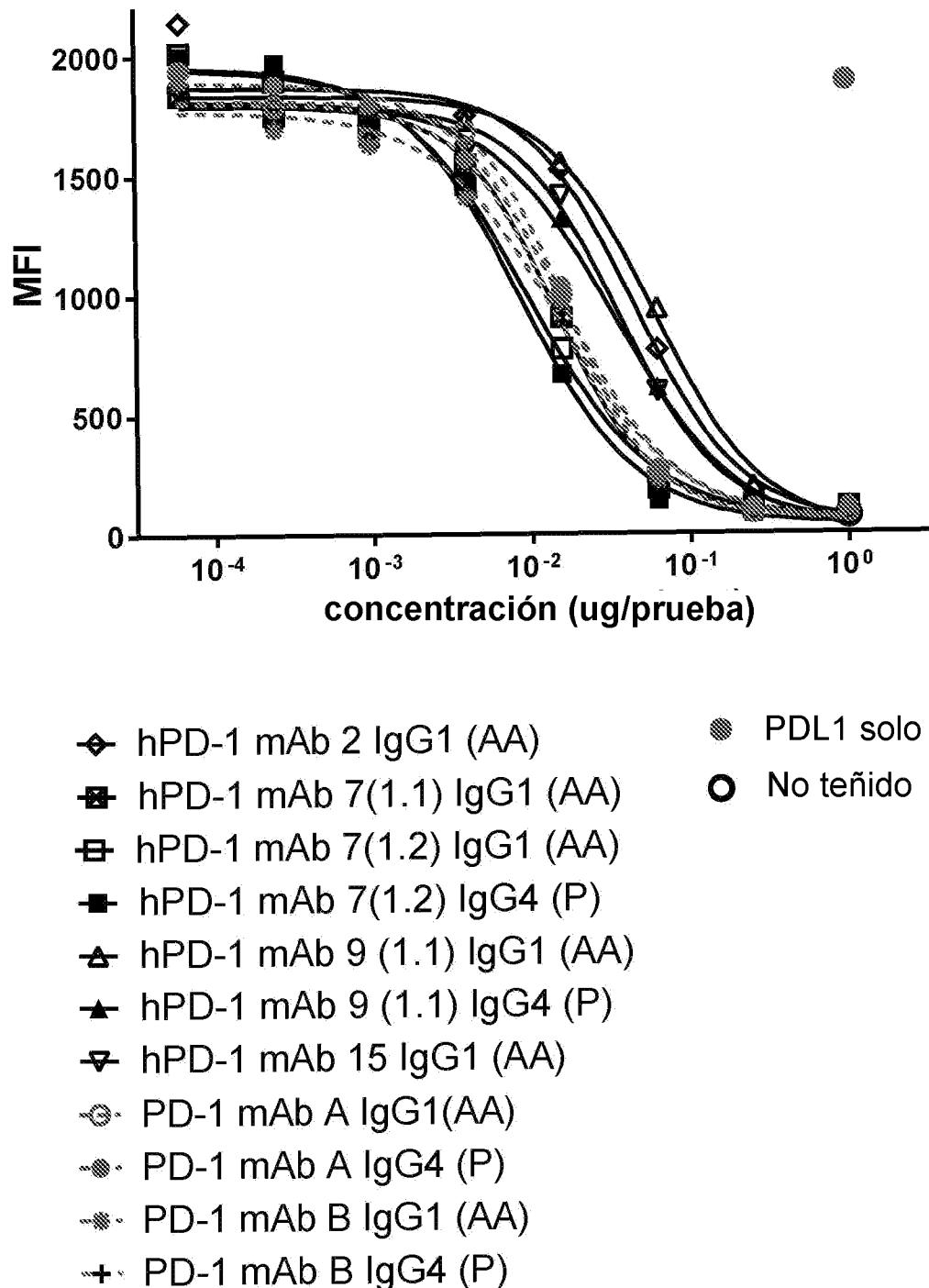
**Figura 10B**

## Curvas de Saturación (dilución 1:4)

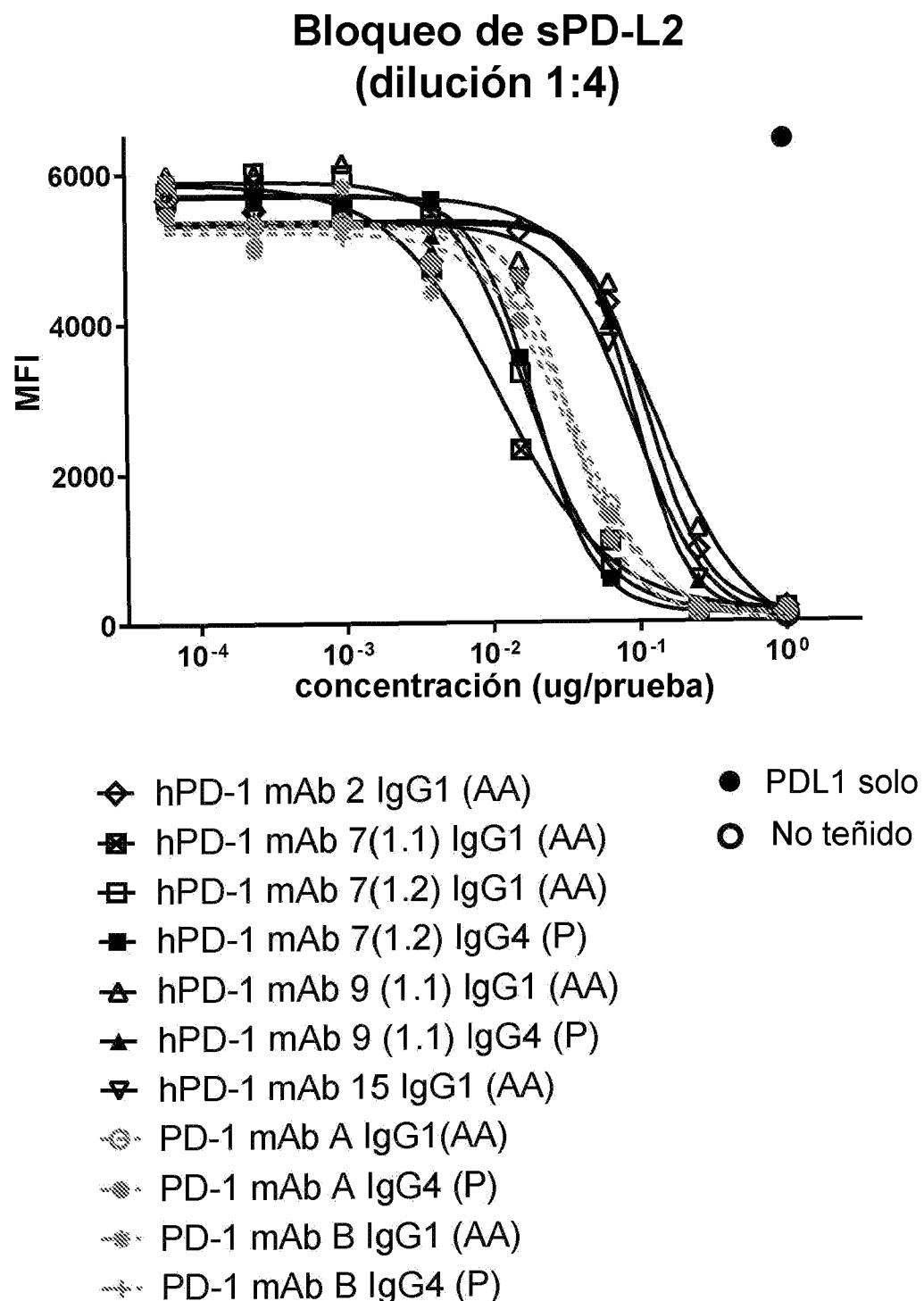


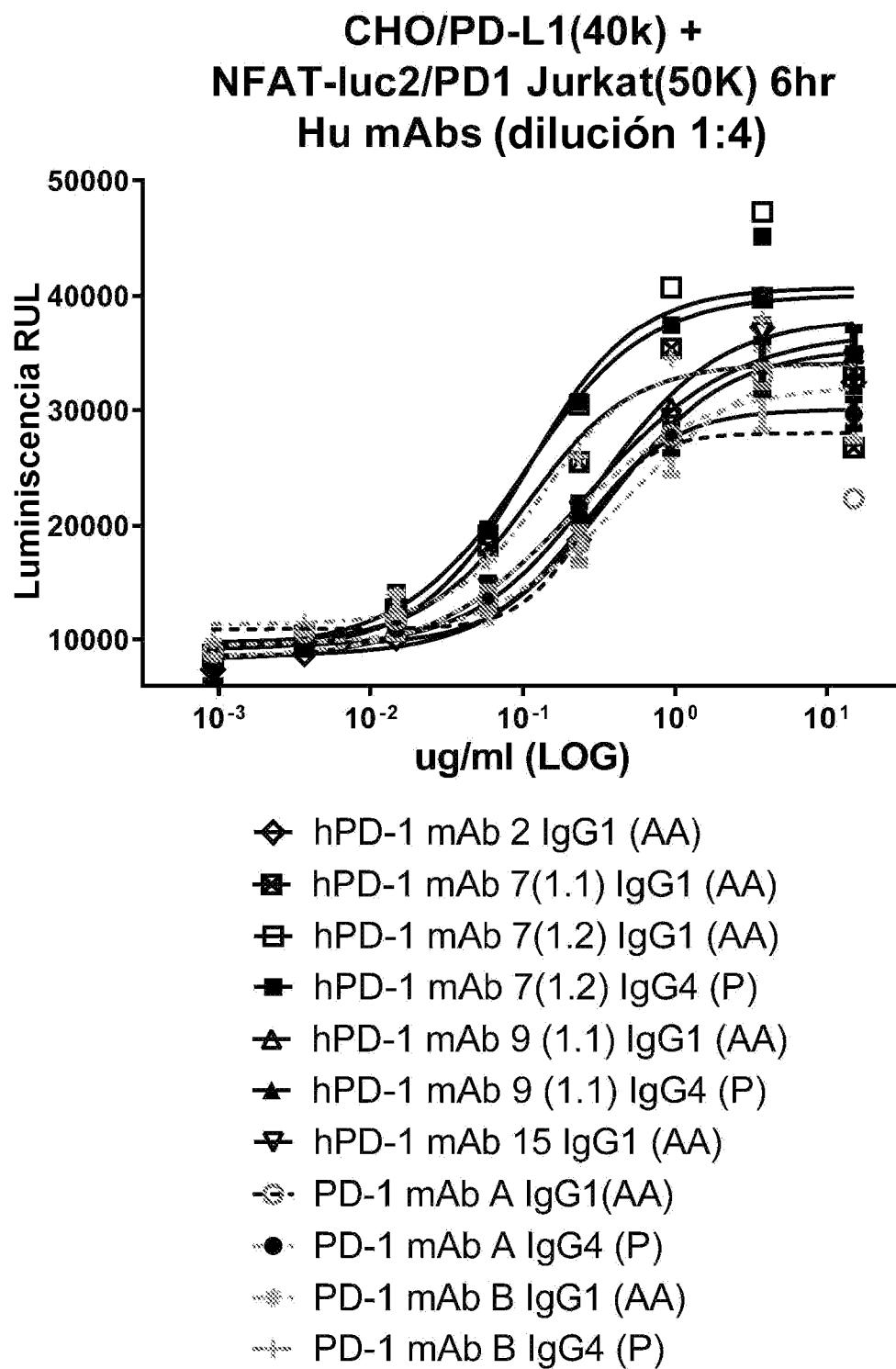
**Figura 11**

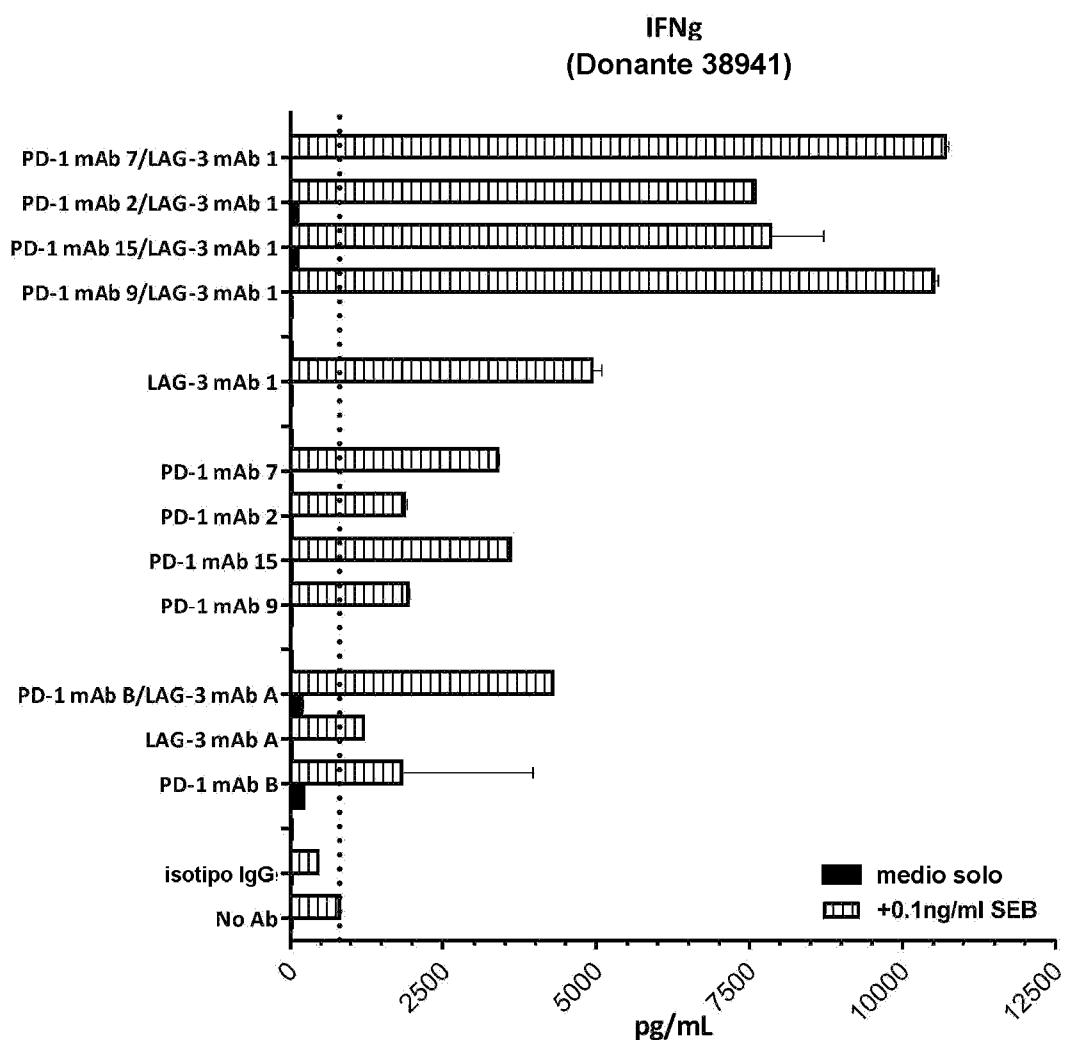
**Bloqueo de sPD-L1**  
**(dilución 1:4)**

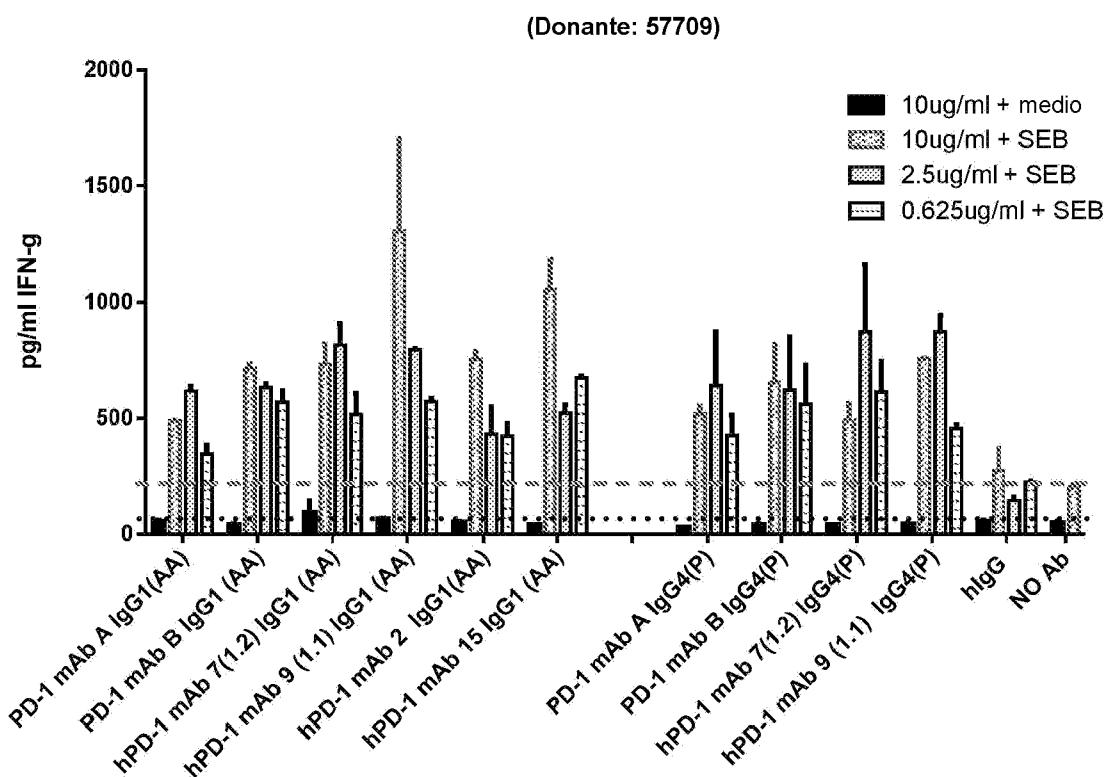


**Figura 12A**

**Figura 12B**

**Figura 13**

**Figura 14**



**Figura 15A**

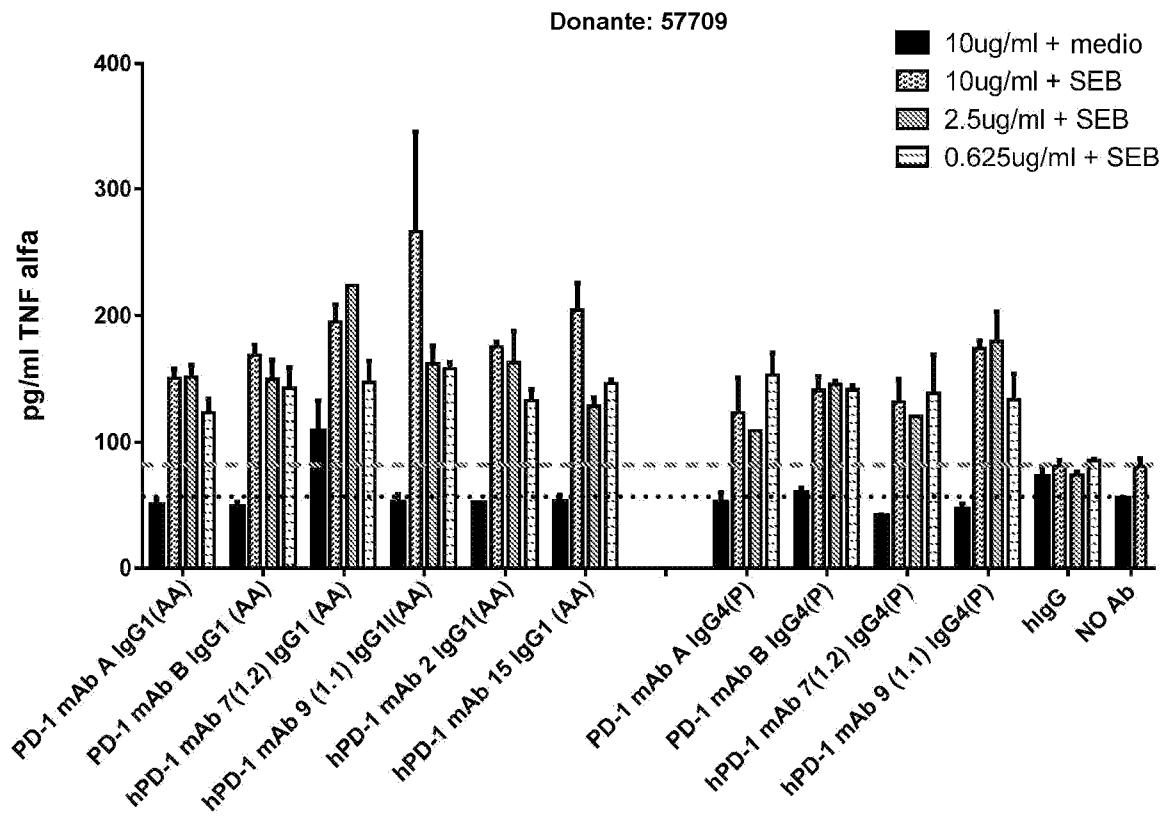


Figura 15B

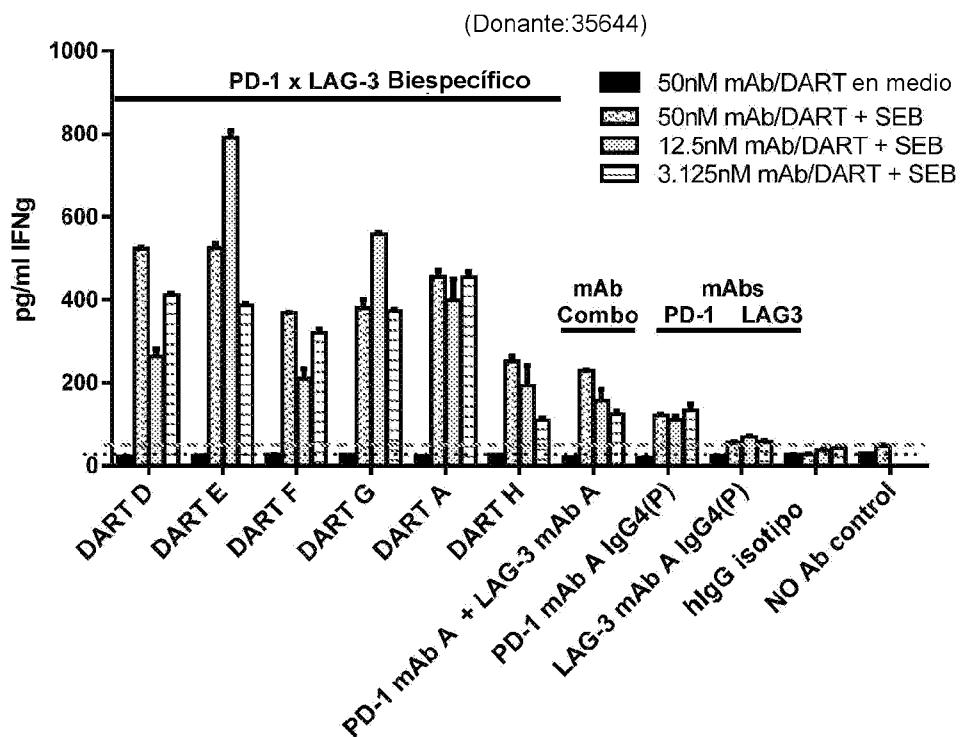


Figura 16A

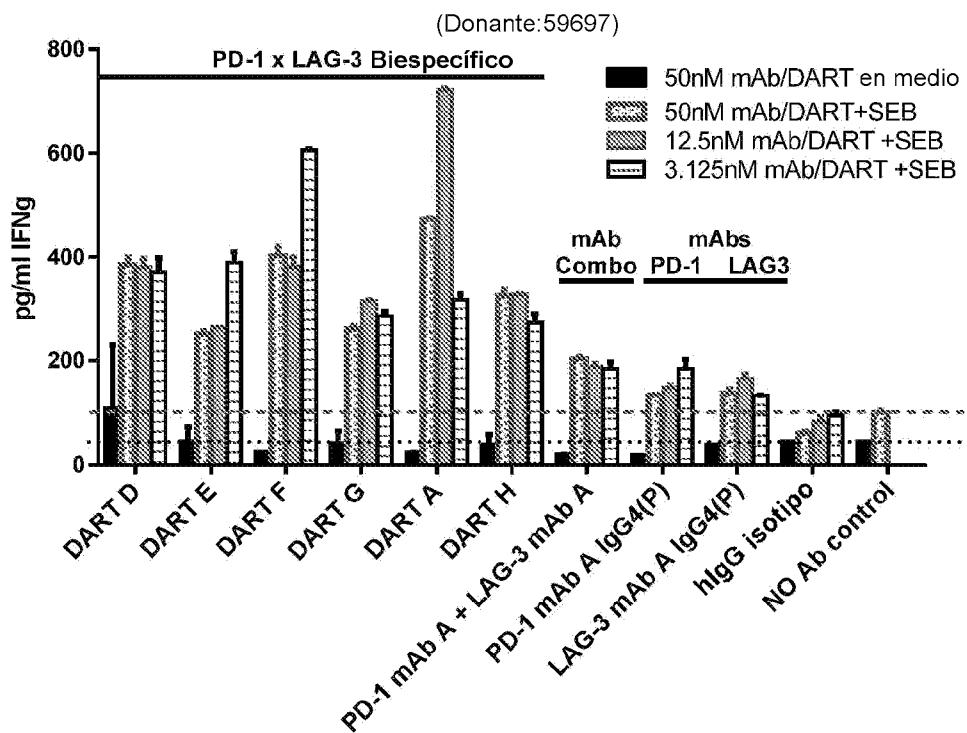


Figura 16B

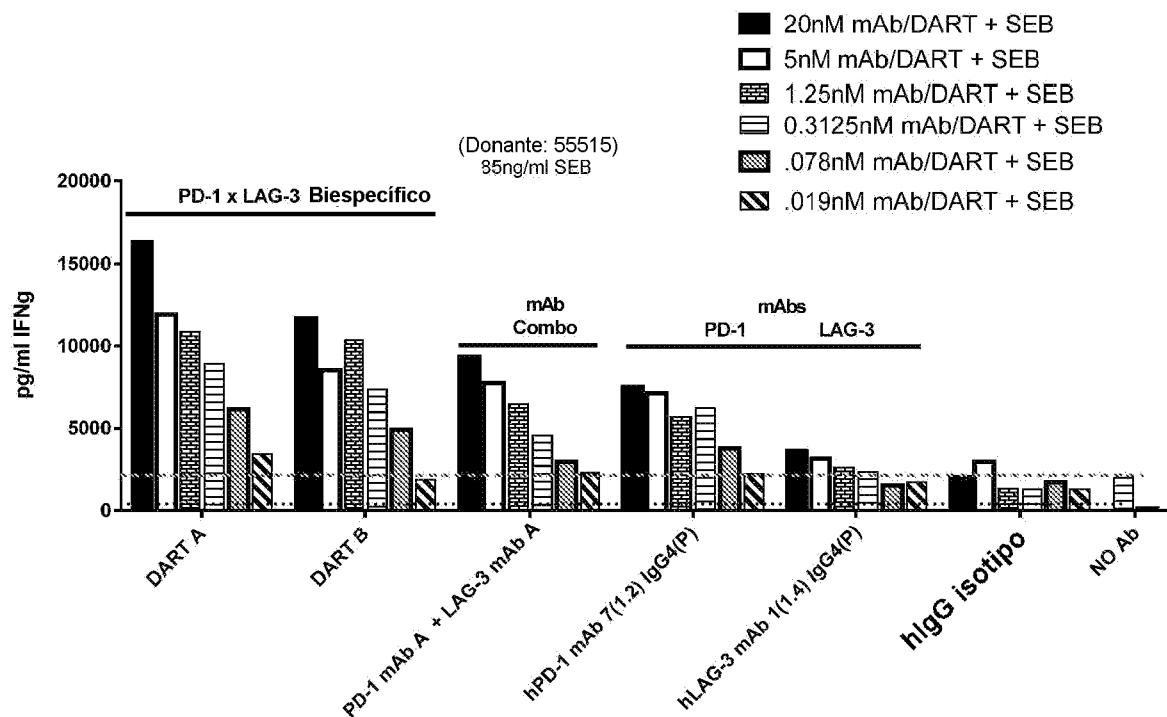


Figura 17A

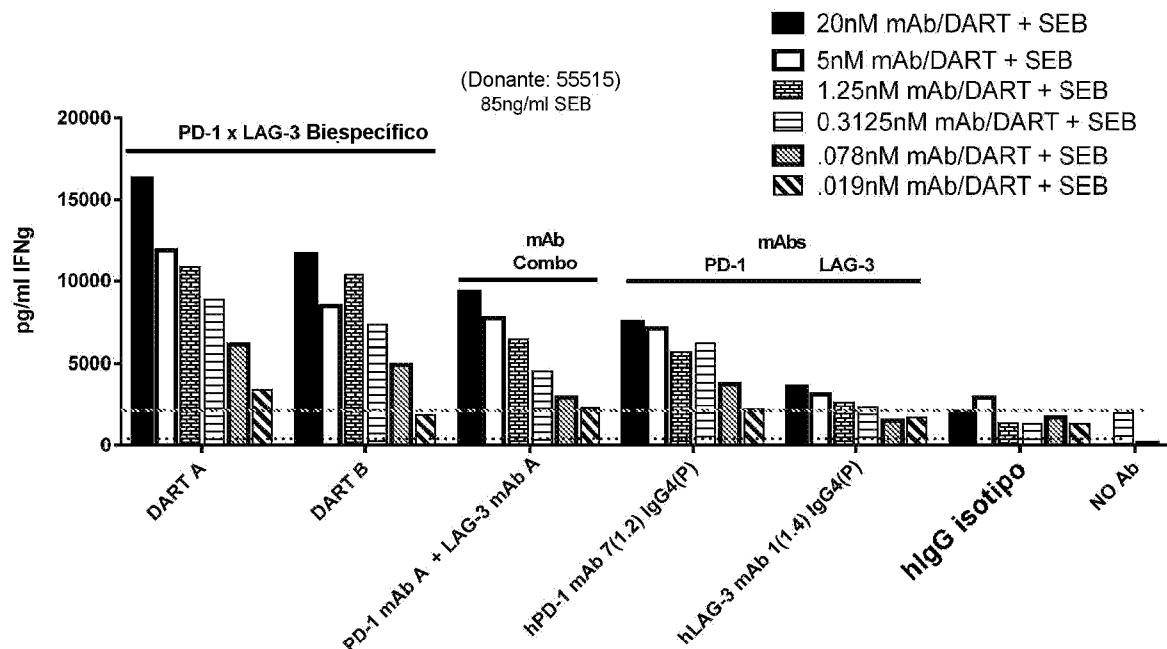


Figura 17B

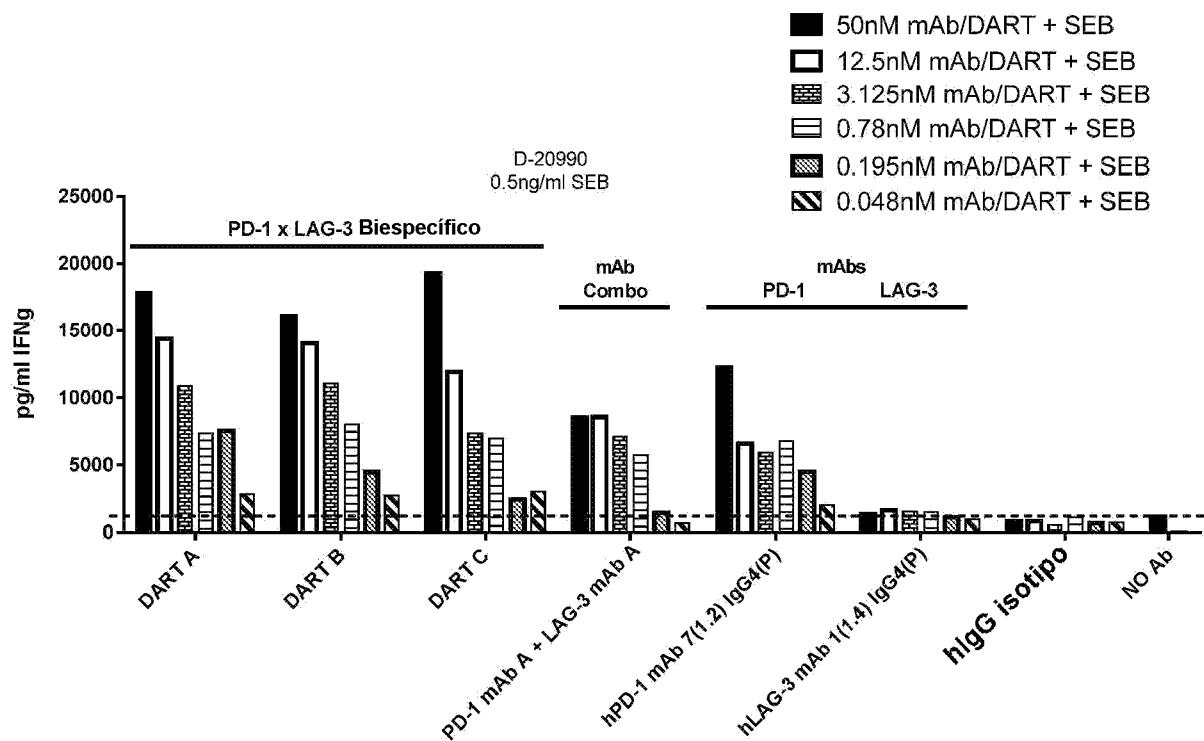


Figura 18A

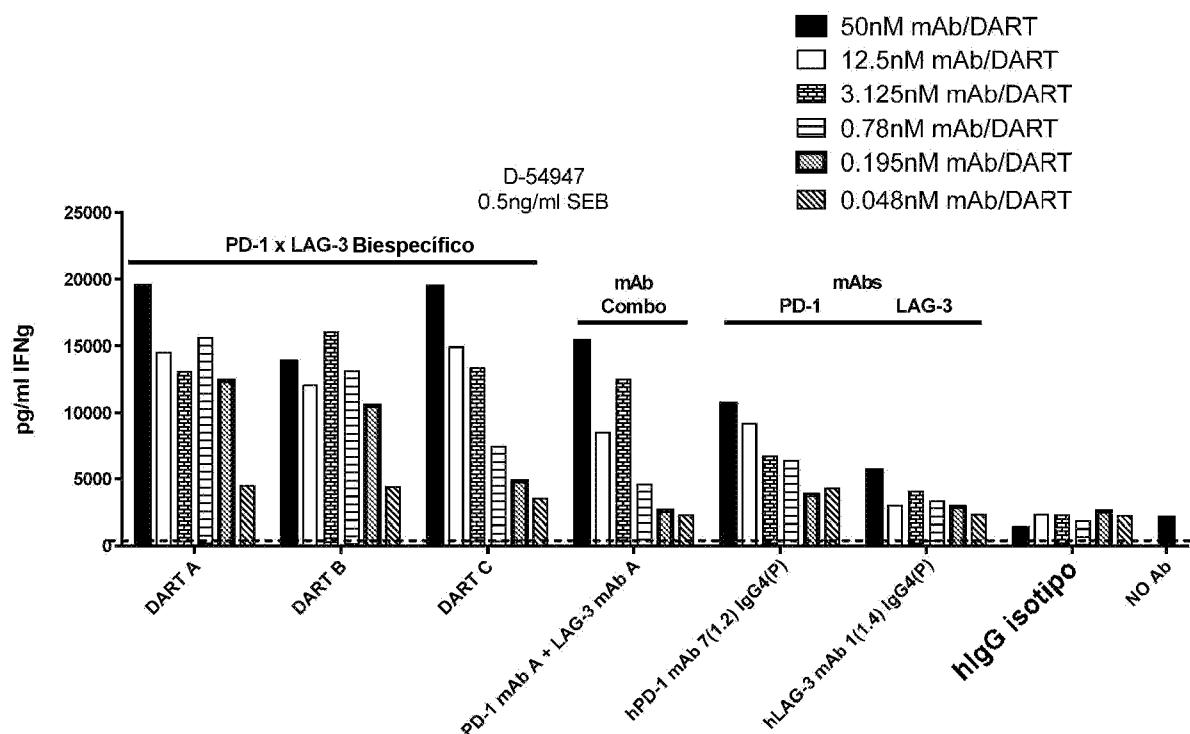


Figura 18B

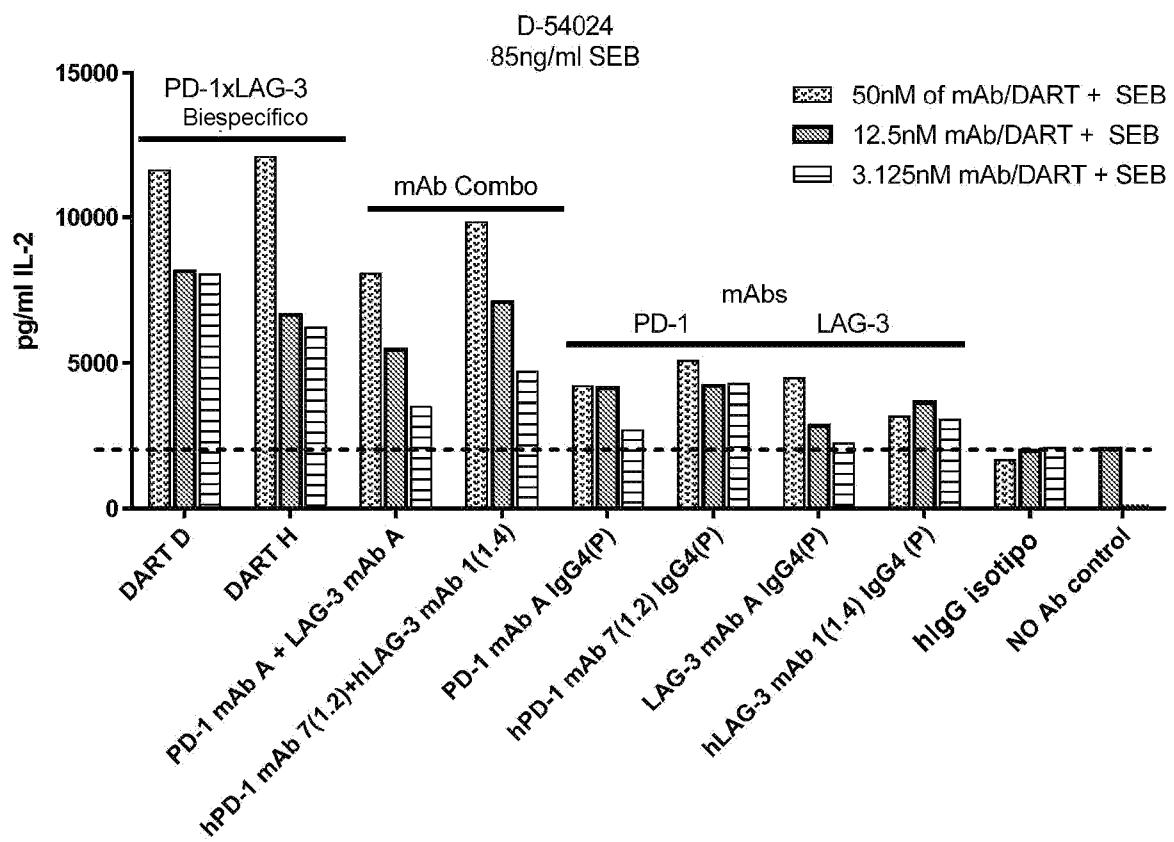


Figura 19

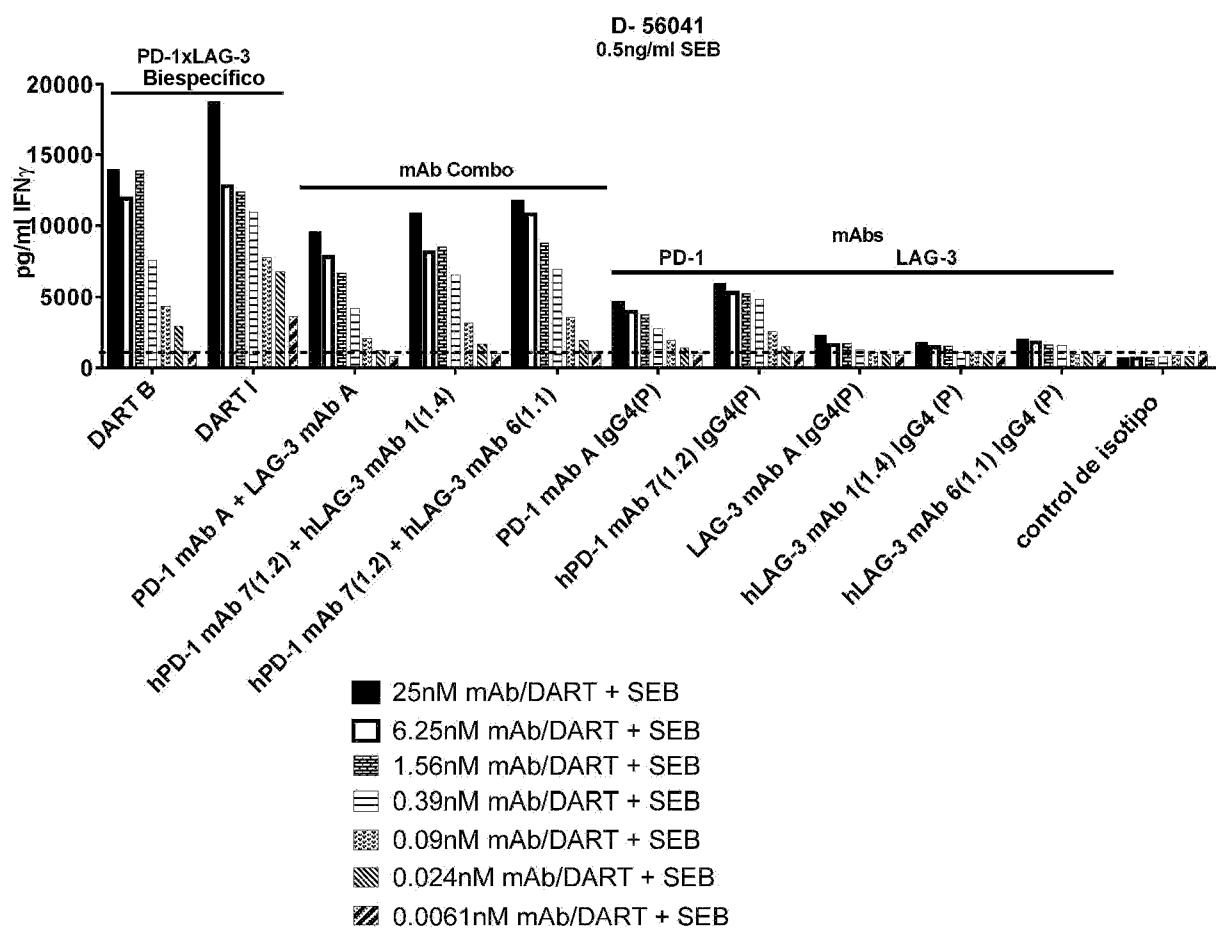
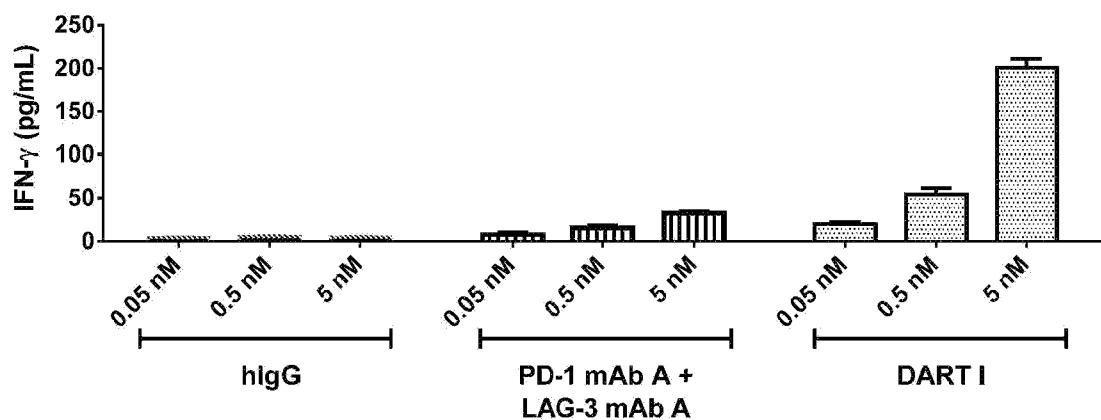
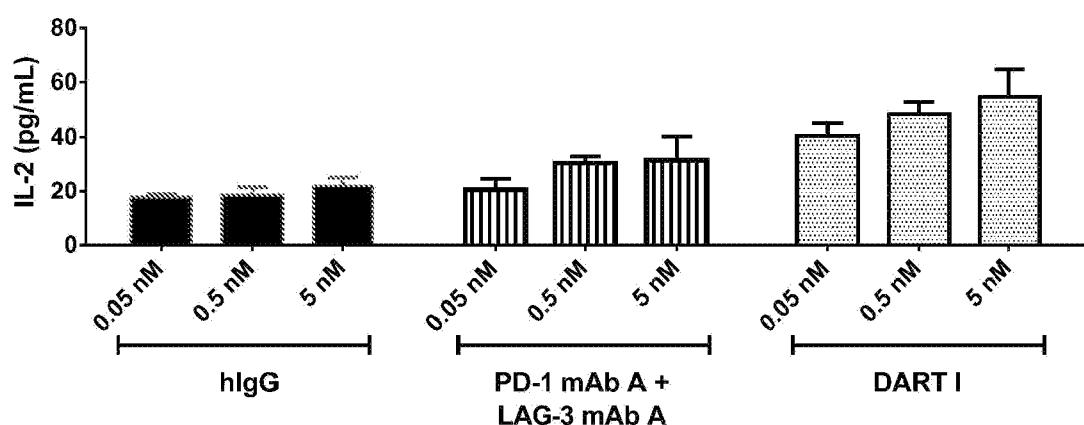


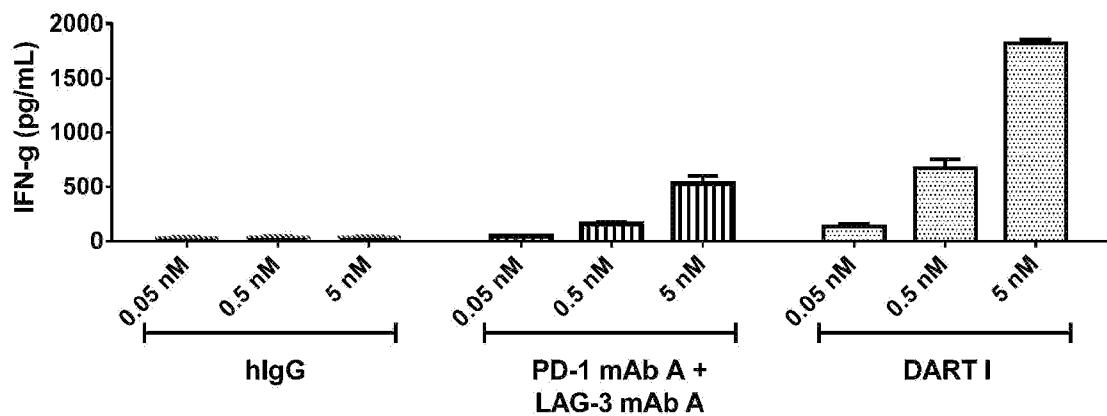
Figura 20



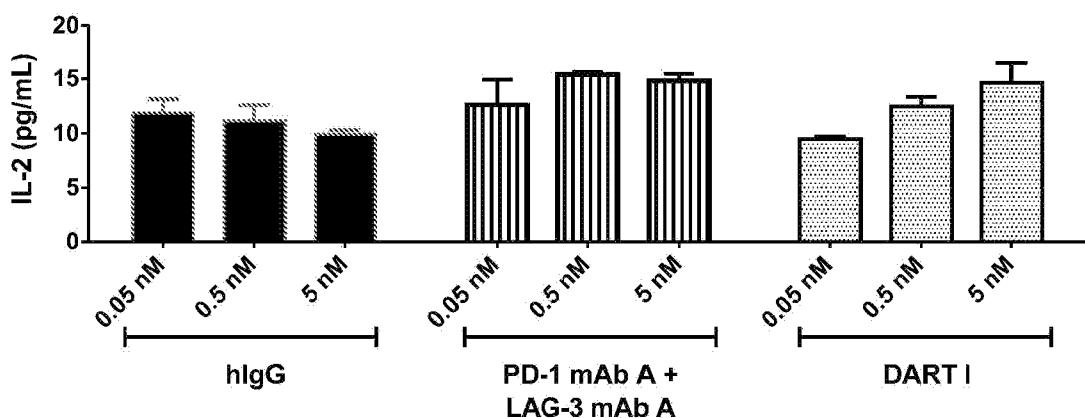
**Figura 21A**



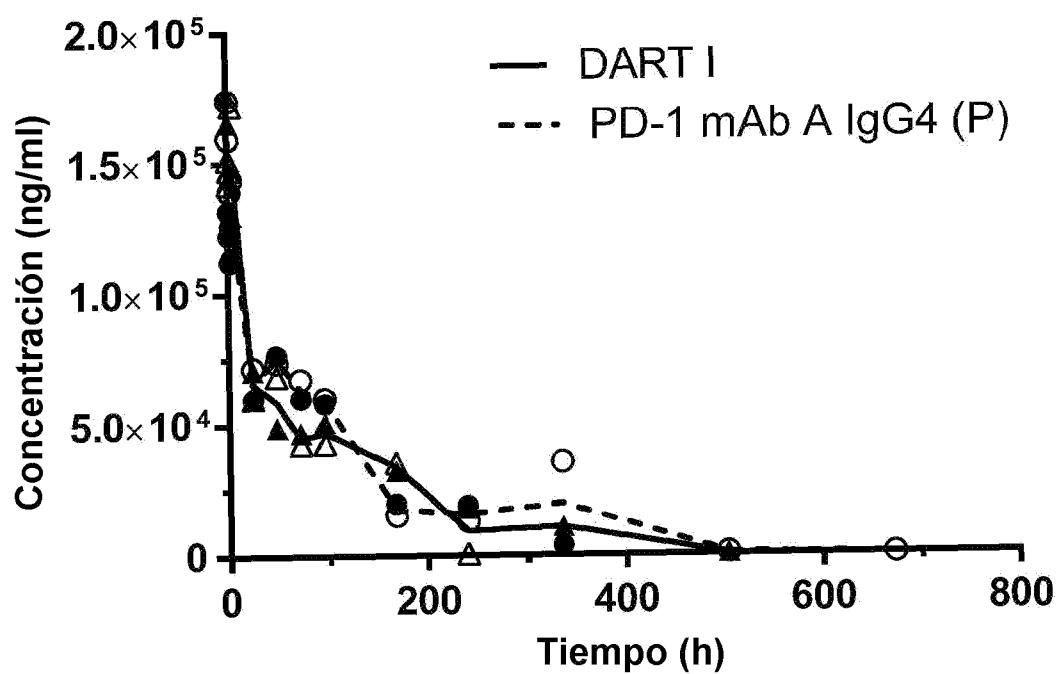
**Figura 21B**



**Figura 21C**



**Figura 21D**



**Figura 22**

hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)

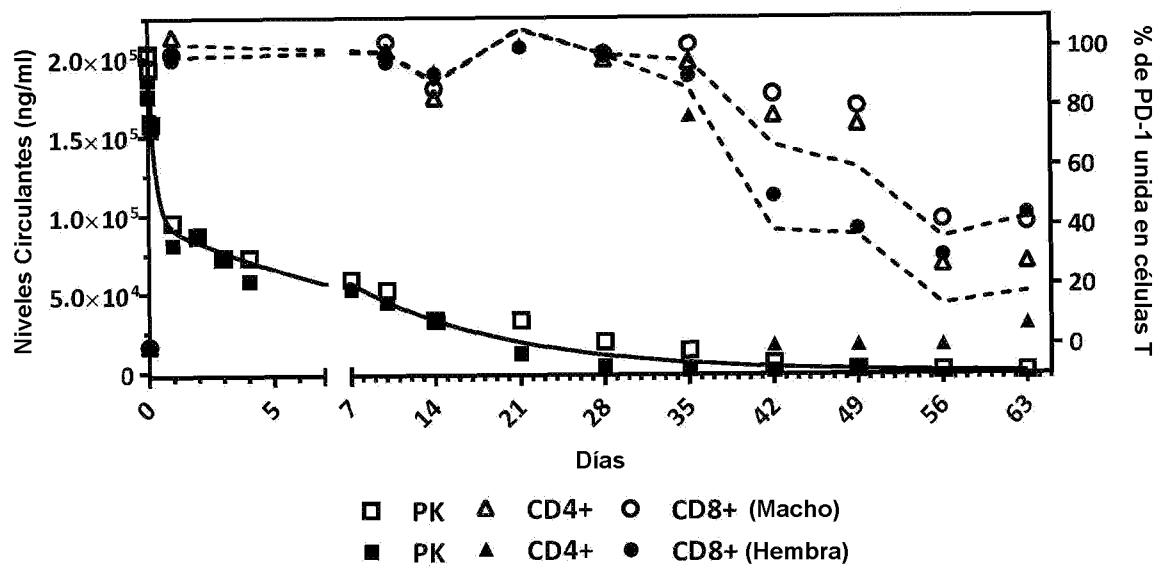


Figura 23A

hPD-1 mAb A IgG4 (P)

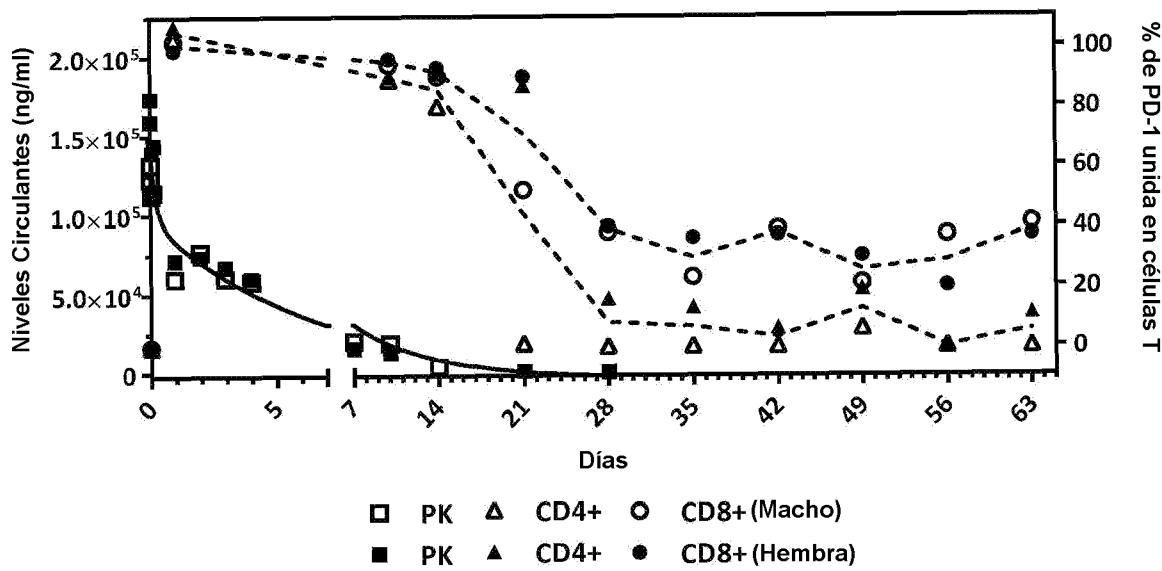
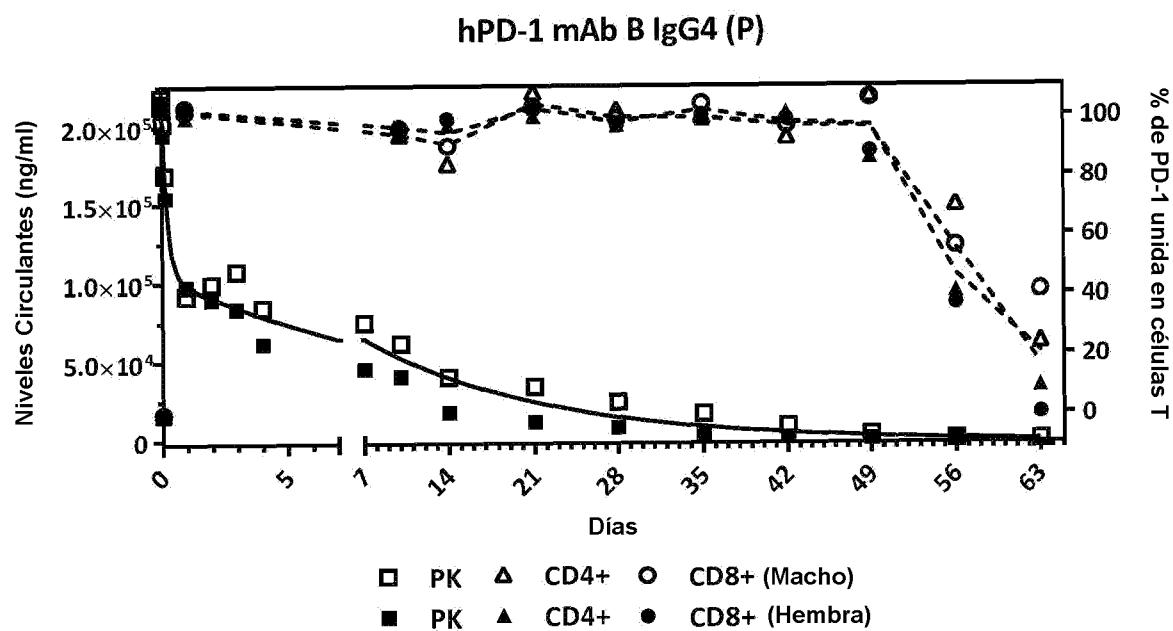


Figura 23B



**Figura 23C**