

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 966 569**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2018 PCT/US2018/067868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2019 WO19133817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2018 E 18897074 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2023 EP 3731875**

54 Título: **Proteínas mono específicas y biespecíficas con regulación de puntos de control inmunitario para la terapia del cáncer**

30 Prioridad:

29.12.2017 US 201762611543 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.04.2024

73 Titular/es:

**AP BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
17F, No. 3, Park St., Nangang District,
Taipei City 115, TW**

72 Inventor/es:

**HER, JENG-HORNG;
YOU, JHONG-JHE;
HSU, CHING-HSUAN;
HUANG, PO-LIN;
KAN, HUNG-TSAI;
CHANG, TING-YI y
HSIEH, HSIN-TA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 966 569 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

Proteínas monoespecíficas y biespecíficas con regulación de puntos de control inmunitario para la terapia del cáncer

5 Antecedentes

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un anticuerpo. Más particularmente, la presente invención se refiere al anticuerpo para la terapia del cáncer.

Descripción del estado de la técnica relacionado

15 Los dos tipos principales de linfocitos en humanos son T (derivados del timo) y B (derivados de la médula ósea). Estas células se derivan de células madre hematopoyéticas en la médula ósea y el hígado fetal que se han comprometido con la vía de desarrollo linfoide. La progenie de estas células madre sigue vías divergentes para madurar y convertirse en linfocitos B o T. El desarrollo de los linfocitos B humanos tiene lugar íntegramente dentro de la médula ósea. Las células T, por otro lado, se desarrollan a partir de precursores inmaduros que abandonan la médula y viajan a través del torrente sanguíneo hasta el timo, donde proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros.

20 Células T

25 Las células T son células asesinas inmunitarias más abundantes (aproximadamente el 75% de los linfocitos sanguíneos) y potentes. El papel de las células T efectoras en la respuesta inmune antitumoral está fuertemente respaldado por estudios *in vitro* y la observación de que una alta infiltración de células T CD8+ en varios tipos de tumores se correlaciona con un pronóstico clínico favorable (Fridman et al., 2012). La activación de células T efectoras no modificadas requiere al menos tres señales complementarias: (i) interacción TCR-CD3/Ag-MHC con la ayuda de correceptores (CD4 o CD8); (ii) unión de moléculas coestimuladoras tales como CD80 o CD86 a CD28, CD40/CD40L; y (iii) moléculas accesorias como las citocinas.

30 La coestimulación o el suministro de dos señales distintas a las células T es un modelo ampliamente aceptado de activación de linfocitaria de linfocitos T en reposo mediante células presentadoras de antígenos (APC) (Lafferty y Cunningham, 1975). Este modelo prevé además la discriminación entre lo propio y lo no propio y la tolerancia inmune (Bretscher y Cohn, 1970; Bretscher, 1999; Jenkins y Schwartz, 1987). La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transduce a través del receptor de células T (TCR) tras el reconocimiento del péptido antigénico extraño presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La segunda señal o coestimuladora se suministra a las células T mediante moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígenos (APC) e induce a las células T a promover la expansión clonal, la secreción de citocinas y la función efectora (Lenschow et al., 1996). En ausencia de coestimulación, las células T pueden volverse refractarias a la estimulación antigénica, no generar una respuesta inmune efectiva y, además, pueden provocar agotamiento o tolerancia a antígenos extraños.

Proteína de punto de control inmunitario: PD-L1 y OX40

45 Los puntos de control inmunitario se refieren a un grupo de vías inhibitorias y estimuladoras iniciadas principalmente por la interacción ligando-receptor que conecta el sistema inmunológico, específicamente la inmunidad mediada por células T, para mantener la autotolerancia y modular la duración y amplitud de las respuestas fisiológicas en los tejidos periféricos para minimizar los daños tisulares colaterales normalmente (Pardoll, 2012). Las células tumorales cooptan ciertas vías de puntos de control como un mecanismo importante de resistencia inmune. Por ejemplo, el ligando de la proteína 1 de muerte celular programada, PD-L1, comúnmente está sobrerregulado en la superficie de las células tumorales de los cánceres humanos. La interacción de PD-L1 con su receptor, PD-1, expresado en linfocitos infiltrados tumorales (TIL), específicamente en células T, inhibe la respuesta local mediada por células T para escapar de la vigilancia inmune (Liang et al., 2006; Sznoj y Chen, 2013). Por lo tanto, la inhibición de señales inmunosupresoras en las células cancerosas, o la estimulación agonística directa de las células T, da como resultado y/o induce una fuerte respuesta inmune antitumoral sostenida. Estudios clínicos recientes sugirieron firmemente que el bloqueo de las proteínas de los puntos de control inmunitario a través de anticuerpos o moduladas por ligandos o receptores solubles son los enfoques más prometedores para activar la inmunidad antitumoral terapéutica (Topalian et al., 2014). Actualmente, la FDA ha aprobado anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) para tratar enfermedades como los melanomas.

60 Otra molécula coestimuladora es el receptor OX40 (CD134), un miembro de la superfamilia TNFR, que está unido a membrana y se expresa principalmente en células T CD4+ activadas (Paterson et al., 1987). La señalización a través del receptor OX40 (en adelante "OX40") es coestimuladora de las células T efectoras y provoca la proliferación de células T (Watts, 2005; Weinberg et al., 1994). Los estudios de OX40 sugieren que su función principal es dictar la cantidad de células T efectoras que se acumulan en las respuestas inmunes primarias y, en consecuencia, gobernar la cantidad de células T de memoria que posteriormente se desarrollan y sobreviven (Croft, 2003). Varios estudios *in*

vitro han demostrado que OX40 proporciona una señal coestimuladora que da como resultado una mayor proliferación de células T y producción de citocinas.

Anticuerpo biespecífico/bifuncional

5 La idea de utilizar anticuerpos biespecíficos para redirigir eficientemente células inmunitarias efectoras hacia células tumorales surgió en la década de 1980 (Karpovsky et al., 1984; Perez et al., 1985; Staerz et al., 1985). Las estructuras biespecíficas generalmente se clasifican en dos grupos principales con diferentes propiedades farmacocinéticas, basadas en la ausencia o presencia de un fragmento Fc, moléculas similares a IgG y pequeños formatos biespecíficos recombinantes, la mayoría de ellos derivados de un fragmento variable de cadena única (scFv). Debido a su tamaño compacto, los fragmentos de anticuerpos generalmente penetran los tumores de manera más eficiente que las moléculas similares a IgG, pero este beneficio se ve mitigado por una vida media en suero corta (unas pocas horas) limitando su absorción tumoral general y el tiempo de residencia (Goldenberg et al., 2007). Por el contrario, la presencia de un fragmento Fc, que se une a los receptores Fc neonatales, proporciona una vida media en suero prolongada (>10 días) a los formatos similares a IgG, favoreciendo la absorción y retención tumoral, pero limita la penetración tumoral.

Estudios recientes han destacado la eficacia terapéutica de la inmunoterapia, una clase de tratamientos contra el cáncer que utilizan el propio sistema inmunológico del paciente para destruir las células cancerosas. Dentro de un tumor, la presencia de una familia de moléculas reguladoras negativas, conocidas colectivamente como "inhibidores de puntos de control", puede inhibir la función de las células T para suprimir la inmunidad antitumoral. Los inhibidores de puntos de control, tales como CTLA-4 y PD-1, atenúan la proliferación de células T y la producción de citocinas. El bloqueo dirigido de CTLA-4 o PD-1 con anticuerpos monoclonales antagonistas (mAb) libera los "frenos" de las células T para estimular la inmunidad antitumoral. Generar respuestas óptimas de células T CD8 "asesinas" también requiere activación del receptor de células T más coestimulación, que puede proporcionarse mediante la ligadura de miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, incluidos OX40 (CD134) y 4-1BB (CD137). OX40 es de particular interés ya que el tratamiento con un mAb anti-OX40 activador (agonista) aumenta la diferenciación de las células T y la función citolítica, lo que conduce a una inmunidad antitumoral mejorada contra una variedad de tumores. Cuando se usan como agentes únicos, estos fármacos pueden inducir potentes respuestas clínicas e inmunológicas en pacientes con enfermedad metastásica (Linch et al., 2015). Se puede encontrar información relevante en la solicitud de patente WO2017/193032; y en Bulliard (2014); *Inmunol. Cell Biol.* 92(6): 457-480.

Resumen

35 La presente divulgación está diseñada para investigar el anticuerpo biespecífico con inmunomodulador destinado al tratamiento de pacientes con cánceres, para lo cual fueron examinados cánceres tales como cáncer de próstata, cáncer de pulmón, NSCLC, melanoma, linfoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, RCC o cáncer de ovario.

El objetivo de la presente invención se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes. Otros aspectos se divulgan en las reivindicaciones subordinadas. La presente divulgación proporciona un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a OX40 (CD134), que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 6, la SEQ ID NO. 8, aminoácido 128-246 de la SEQ ID NO. 10, y aminoácido 124-241 de la SEQ ID NO. 13; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácido 1-108 de la SEQ ID NO. 5, 1-108 de la SEQ ID NO. 7, 1-112 de la SEQ ID NO. 10, y 1-108 de la SEQ ID NO. 13.

En una realización, el anticuerpo o su porción de unión a antígeno es una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOS. 10, 11, 12 y 13.

En una realización, el anticuerpo o su porción de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico.

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende un sitio de unión a proteína de punto de control inmunitario.

55 En una realización, el sitio de unión a la proteína de punto de control inmunitario comprende un sitio de unión al ligando de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-L1), un sitio de unión a PD-1, un sitio de unión al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un sitio de unión al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), un sitio de unión al antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) o un sitio de unión al gen 3 de activación de linfocitos (LAG3).

60 (No cubierto por las presentes reivindicaciones) Se describe un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a PD-L1, que comprende: un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 2 y la SEQ ID NO. 4; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80% de homología con la secuencia

de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácido 1-111 de la SEQ ID NO. 1 y 1-110 de la SEQ ID NO. 3.

5 La presente divulgación también proporciona un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a OX40 y PD-L1, comprendiendo el anticuerpo biespecífico al menos una de las cadenas polipeptídicas, en donde la cadena polipeptídica comprende un sitio de unión a OX40 y un sitio de unión a PD-L1. El sitio de unión de OX40 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 6, la SEQ ID NO. 8, aminoácido 128-246 de la SEQ ID NO. 10, y aminoácido 124-241 de la SEQ ID NO. 13; y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácido 1-108 de la SEQ ID NO. 5, 1-108 de la SEQ ID NO. 7, 1-112 de la SEQ ID NO. 10 y 1-108 de la SEQ ID NO. 13. El sitio de unión de PD-L1 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 2 y la SEQ ID NO. 4; y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácido 1-111 de la SEQ ID NO. 1 y 1-110 de la SEQ ID NO. 3.

15 En una realización, la cadena polipeptídica comprende además un dominio Fc, un fragmento Fab y un scFv. El fragmento Fab está conectado al extremo terminal N del dominio Fc y el fragmento Fab comprende el sitio de unión de PD-L1. El scFv está conectado al extremo terminal C del dominio Fc y el scFv comprende el sitio de unión a OX40.

20 En una realización, la cadena polipeptídica comprende además un enlazador entre el dominio Fc y el scFv.

25 En una realización, el scFv comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en aminoácido 455-707 de la SEQ ID NO. 18, 455-708 de la SEQ ID NO. 19, 455-701 de la SEQ ID NO. 20, 455-706 de la SEQ ID NO. 21, 455-706 de la SEQ ID NO. 22, 455-706 de la SEQ ID NO. 23, 455-706 de la SEQ ID NO. 24, 455-706 de la SEQ ID NO. 25, 455-706 de la SEQ ID NO. 26, 455-706 de la SEQ ID NO. 27, 455-706 de la SEQ ID NO. 28, y 455-706 de la SEQ ID NO. 29.

En una realización, el anticuerpo biespecífico comprende un par de cadenas polipeptídicas.

30 En una realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY.

En una realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG.

35 En una realización, el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende el anticuerpo biespecífico mencionado anteriormente y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), melanoma, linfoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales (RCC) y cáncer de ovario.

45 La presente divulgación también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, su porción de unión a antígeno o el anticuerpo biespecífico como se mencionó anteriormente.

Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplos y pretenden proporcionar una explicación adicional de la invención tal como se reivindica.

50 Breve descripción de los dibujos

La invención se puede comprender mejor leyendo la siguiente descripción detallada de la realización, con referencia a los dibujos adjuntos, como sigue:

55 La Fig. 1 muestra puntos de control inmunitarios que modulan la inmunidad mediada por células T. Se podrían utilizar anticuerpos agonistas o antagonistas contra los puntos de control, tales como anti-ICOS, anti-CD28, anti-OX40 y anti-CD27, o anti-PD-1, anti-CTLA4, anti-LAG3, anti-BTLA, para construir la proteína de fusión bifuncional dependiendo de las aplicaciones.

60 Las Figs. 2A y 2B muestran la detección del clon de fago mediante ELISA directo para células HEK293 con expresión de PD-L1.

Las Figs. 3A y 3B muestran la detección del clon de fago mediante ELISA basado en células con células HEK293 con expresión de OX40.

65

La Fig. 4 muestra candidatos de anticuerpos purificados específicos para PD-L1 mediante SDS-PAGE con reactivo no reductor para revelar la integridad y la pureza.

5 La Fig. 5 muestra candidatos de anticuerpos purificados específicos para OX40 mediante SDS-PAGE con reactivo reductor o no reductor para revelar la integridad y la pureza.

10 La Fig. 6 muestra ejemplos de la actividad de unión directa al ligando de proteínas de puntos de control antiinmunes purificadas y candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 frente a PD-L1. Los pocillos recubiertos previamente con ligando se incubaron primero con diversas concentraciones de candidatos de anticuerpos como se indica. Las proteínas unidas se detectaron luego con anticuerpo específico de Fab IgG anti-humano de cabra conjugado con HRP y se representaron gráficamente las lecturas de OD₄₅₀.

15 La Fig. 7 muestra ejemplos de la actividad de unión directa al ligando de proteínas de puntos de control antiinmunitarios purificadas y candidatos de anticuerpos anti-OX40 frente a OX40. Los pocillos recubiertos previamente con ligando se incubaron primero con diversas concentraciones de candidatos de anticuerpos como se indica. Las proteínas unidas se detectaron luego con anticuerpo específico de Fab IgG anti-humano de cabra conjugado con HRP y se representaron gráficamente las lecturas de OD₄₅₀.

20 La Fig. 8 muestra el análisis de flujo utilizando células 293 de expresión de PD-L1. Las células HEK293 con expresión de PD-L1 se incubaron primero con candidatos de anticuerpos purificados y los anticuerpos unidos se detectaron con anti-IgG humana de cabra conjugada con Alexa-488 (H+L), seguido de un análisis del clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

25 La Fig. 9 muestra el análisis de flujo utilizando células 293 de expresión de OX40. Las células HEK293 con expresión de OX40 se incubaron primero con candidatos de anticuerpos anti-OX40 purificados y los anticuerpos unidos se detectaron con anti-IgG humana de cabra conjugada con Alexa-488 (H+L), seguido de análisis FACS. NS: sin tinción.

30 La Fig. 10 muestra el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 con anticuerpos anti-PD-L1 purificados. Los anticuerpos purificados como se indica se aplicaron con PD-1-Fc biotinilado y células PD-L1-293F para evaluar la actividad de inhibición de la interacción PD-1/PD-L1. La unión de PD-1-Fc recombinante en células PD-L1-293F se detectó mediante estreptavidina-Alexa-488 y análisis mediante FACS.

35 Las Figs. 11A y 11B muestran que los candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 con 1 o 10 µg/mL estimulan la proliferación de células T e inducen la producción de IL-2 y/o IFN-γ en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) después de 3 días (Fig. 11A) o 5 días (Fig. 11B) de tratamiento con anticuerpos.

40 La Fig. 12A muestra la capacidad de candidatos de anticuerpos anti-OX40 para mejorar la activación de las células T CD3+ con respuesta a la dosis, así como con el anticuerpo de referencia. La Fig. 12B muestra la concentración de IL-2 e IFN-γ humanos presentes en medios de cultivo celular después de 3 días de estimulación de células T humanas con anti-CD3 unido a placa y varias concentraciones de candidatos de anticuerpos anti-OX40.

45 Las Figs. 13A y 13B muestran la concentración de IL-2 humana (Fig. 13A) e IFN-γ (Fig. 13B) presentes en medios de cultivo celular después de 3 días de estimulación de células T humanas con anti-CD3 unido a placa y varias concentraciones de candidatos de anticuerpos específicos de OX40.

La Fig. 14 muestra la estructura de una Fc de cadena pesada de anticuerpo fusionada con un dominio scFv específico de OX40.

50 La Fig. 15 muestra ejemplos de análisis en gel PAGE de anticuerpos anti-punto de control inmunitario-proteínas de fusión OX40 humana. Se demostró que las proteínas de fusión purificadas, las proteínas de fusión scFv anti-PD-L1-OX40 tienen un peso molecular de aproximadamente 220 kDa (no reductoras), y la fusión de cadena pesada tiene aproximadamente 85 kDa y la cadena ligera es de aproximadamente 25 kDa (reducida) en ambas fusiones de anticuerpos.

55 Las Figs. 16A y 16B muestran que el anticuerpo biespecífico estimula sinérgicamente la activación de células T para la producción de IL-2 e IFN-γ en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) después de 3 días (Fig. 16A) o 5 días (Fig. 16B) con un tratamiento con un solo anticuerpo, combinado o biespecífico con scFv anti-PD-L1-OX40.

60 Las Figs. 17A a 17E respectivamente muestran la agregación y determinación de la pureza de anticuerpos biespecíficos, Ab anti-PD-L1-OX40 y Ab-V1 a V4 anti-PD-L1-OX40, con 5 enlazadores diferentes en scFv de OX40.

La Fig. 18 muestra variantes de secuencia entre scFv del clon B17 de OX40 de Ab-V4 a V12 anti-PD-L1-OX40 (SEQ ID NOS: 30-38).

65 La Fig. 19 muestra ejemplos de análisis en gel PAGE de anticuerpos anti-punto de control inmunitario-proteínas de fusión OX40 humana. Se demostró que las proteínas de fusión purificadas, las proteínas de fusión Ab-V5 anti-PD-L1-

OX40 tienen un peso molecular de aproximadamente 220 kDa (no reductoras), y la fusión de la cadena pesada tiene aproximadamente 80 kDa y la cadena ligera es de aproximadamente 30 kDa (reducida) en ambas fusiones de anticuerpos.

5 La Fig. 20 muestra un diagrama de flujo que ilustra el método de ELISA para la evaluación de la actividad de unión de variantes de anticuerpos biespecíficos.

La Fig. 21 muestra la actividad de unión de PD-L1 humana de las variantes de anticuerpos biespecíficos y su EC50.

10 La Fig. 22 muestra la actividad de unión a OX40 humano de las variantes de anticuerpos biespecíficos y su EC50.

La Fig. 23 muestra la estabilidad en suero *ex vivo* de la variante de anticuerpo biespecífico, Ab-V5 anti-PD-L1-OX40.

15 Las Figs. 24A y 24B muestran la producción de IL-2 durante 3 días (Fig. 24A) y la producción de IFN- γ durante 5 días (Fig. 24B) después de modular células T con un tratamiento con un solo anticuerpo, combinado o biespecífico con Ab-V5 anti-PD-L1-OX40.

La Fig. 25 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con anticuerpo biespecífico Ab-V5 anti-PD-L1-OX40 y el tratamiento con anticuerpo monoclonal sobre el crecimiento del tumor PC-3 en ratones Fox Chase SCID@Beige.

20 Descripción detallada

25 En el presente documento se divulgan anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a OX40 (CD134), como se define en las reivindicaciones 1-5 adjuntas. Además se divulgan en el presente documento anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a OX40 y PD-L1, como se define en las reivindicaciones adjuntas 6-13. Sus respectivos ácidos nucleicos codificantes también se divulgan de acuerdo con las reivindicaciones 16-17 adjuntas. También se divulgan composiciones farmacéuticas de anticuerpos biespecíficos para uso en el tratamiento del cáncer, como se define en las reivindicaciones 14-15.

30 En particular, en el presente documento se divulga la expresión, purificación y caracterización de proteínas bifuncionales con scFv de OX40 agonista funcional aislado de acuerdo con la invención fusionado al extremo terminal C del dominio Fc de anticuerpos de proteína anti-punto de control inmunitario. Estas proteínas interactúan con su correspondiente punto de control diana y transmitirán la señal inhibitoria o estimuladora para modular la inmunidad de las células T involucradas. Los componentes de las proteínas de fusión Fc en la presente invención son de todos los orígenes humanos y, por lo tanto, se espera que no sean inmunogénicos y puedan usarse como terapéuticos en humanos.

35 Las moléculas biespecíficas tales como los anticuerpos biespecíficos (AbBs) proporcionan un medio para dirigirse simultáneamente a múltiples epítomos en la misma diana molecular o en diferentes dianas con un único agente terapéutico. Como compuestos terapéuticos contra el cáncer, tienen el potencial de conferir actividades novedosas o más potentes, reducir el coste de los productos y facilitar el desarrollo de nuevos regímenes terapéuticos en contraste con una mezcla de dos mAb (Chames y Baty, 2009; Hollander, 2009; Thakur y Lum, 2010). Recientemente, catumaxomab, un anticuerpo biespecífico trifuncional dirigido a la molécula de adhesión de células epiteliales humanas (EpCAM) y CD3, ha demostrado un claro beneficio clínico en pacientes con carcinomatosis peritoneal de cánceres epiteliales (Heiss et al., 2010) y un anticuerpo biespecífico que interactúa con células T (BiTE) con especificidad dual para CD19 y CD3 también ha demostrado una actividad clínica alentadora en pacientes con neoplasias malignas hematológicas que expresan CD19 (Bargou et al., 2008). A pesar del gran interés en el desarrollo de moléculas biespecíficas como terapia contra el cáncer, los desafíos técnicos en la producción de moléculas biespecíficas estables y activas han obstaculizado en el pasado la evaluación clínica de la mayoría de los formatos biespecíficos. Muchos formatos de anticuerpos diseñados, incluido un anticuerpo biespecífico similar a IgG, tienen una estabilidad o solubilidad comprometida (Bargou et al., 2008; Demarest y Glaser, 2008; Lu et al., 2005). Además, se han adoptado varias estrategias para aumentar la calidad del producto y la estabilidad *in vivo* de moléculas biespecíficas, incluida la PEGilación, la conjugación con albúmina sérica humana y la modificación de Fc (Muller et al., 2007; Ridgway et al., 1996). Los anticuerpos biespecíficos de cadena sencilla de la forma general descrita anteriormente tienen la ventaja de que la secuencia de nucleótidos que codifica los cuatro dominios V, dos enlazadores y un espaciador se puede incorporar en un organismo de expresión huésped adecuado bajo el control de un único promotor. Esto aumenta la flexibilidad con la que se pueden diseñar estas construcciones, así como el grado de control del experimentador durante su producción. Además, el Fc de IgG es otra estructura atractiva para diseñar nuevos compuestos terapéuticos porque contiene todas las funciones del anticuerpo excepto la capacidad de unión. La modificación de Fc es importante para mejorar la eficacia de los anticuerpos biespecíficos. Por lo tanto, la conformación basada en IgG se utiliza en la presente invención para dos dianas independientes en células inmunitarias o células diana en inmunoterapia.

60 El direccionamiento de las proteínas de los puntos de control inmunitario es un enfoque prometedor para activar la inmunidad antitumoral. Las proteínas anti-puntos de control, tales como PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, etc., actualmente se evalúan clínicamente (Fig. 1). Se ha demostrado que los datos preliminares con bloqueadores de proteínas de puntos de control inmunitario pueden mejorar la inmunidad antitumoral con el potencial de producir

respuestas clínicas duraderas. Sin embargo, a pesar de la notable eficacia clínica de estos agentes en una serie de tumores malignos, ha quedado claro que no son suficientemente activos para muchos pacientes. Numerosas vías inmunomoduladoras adicionales, así como factores inhibidores expresados o secretados por células mieloides y estromales en el microambiente tumoral, son dianas potenciales para crear sinergia con el bloqueo de los puntos de control inmunitario. Por lo tanto, combinar terapias anticancerígenas o con anticuerpos biespecíficos ha sido fundamental para conseguir la remisión completa y la cura de los pacientes con cáncer.

También se divulga en el presente documento la construcción, expresión y caracterización de Fc del anticuerpo anti-proteína de punto de control inmunitario fusionado con diferentes proteínas scFv específicas de proteína de punto de control inmunitario. El scFv de OX40 posicionado en el extremo terminal C de la invención en construcciones de fusión permitirá expandir el poder de las proteínas de fusión más allá del enfoque de activación de OX40 si la contraparte de la fusión es un agente potenciador del sistema inmunológico, tal como un anticuerpo anti-EGFR, anti-HER2 o anti-CTLA-4, por ejemplo.

15 Generación de anticuerpos a partir de la biblioteca OmniMab

Para la generación de anticuerpos terapéuticos contra PD-L1 u OX40, se llevaron a cabo selecciones con la biblioteca de fagémidos OmniMab. La biblioteca de fagémidos es generada por AP Biosciences Inc. (APBio Inc.) a partir de una colección de más de cien células B de donantes sanos. Hyperphage (M13K07ΔpIII, Progen, Heidelberg, Alemania) preparó los fagos para la primera ronda de análisis. Se aplicaron análisis en fase sólida y análisis de células contra PD-L1 u OX40 para la selección y el aislamiento del aglutinante específico de PD-L1 u OX40 de la biblioteca OmniMab. La selección en fase sólida se realizó utilizando PD-L1-Fc u OX40-Fc humano recombinante (APBio Inc.) en la primera ronda de selección y luego se usaron PD-L1 u OX40 expresados por células HEK293 para un enriquecimiento de dos y tres rondas. Después de tres rondas de selección, los aglutinantes específicos de PD-L1 u OX40 se seleccionaron y aislaron mediante ELISA directo o ELISA basado en células con la proteína recombinante correspondiente (Figs. 2A, 2B, 3A y 3B). Se transfirieron proteínas recombinantes PD-L1-Fc previamente recubiertas o células 293 con expresión de OX40 con sobrenadante que contenía fagos rescatados durante 1 hora y se lavaron con PBS que contenía Tween-20 al 0.1 % tres veces. Los fagos unidos se detectaron mediante anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Roche) y se usó sustrato TMB para el desarrollo de la señal. Se registraron las lecturas de OD450. Los aglutinantes positivos se aislaron y se enviaron para secuenciación para confirmar la secuencia y diversidad de la cadena pesada y la cadena ligera. La región variable de cadena pesada y cadena ligera específica de PD-L1 u OX40 se describió a partir de la SEQ ID NO. 1 a la SEQ ID NO. 8: la SEQ ID NO. 1 es la cadena ligera del clon 6 de PD-L1, la SEQ ID NO. 2 es la región variable de la cadena pesada del clon 6 de PD-L1, la SEQ ID NO. 3 es la cadena ligera del clon 32 de PD-L1, la SEQ ID NO. 4 es la región variable de la cadena pesada del clon 32 de PD-L1, la SEQ ID NO. 5 es la cadena ligera del clon B17 de OX40, la SEQ ID NO. 6 es la región variable de la cadena pesada del clon B17 de OX40, la SEQ ID NO. 7 es la cadena ligera del clon B19 de OX40, la SEQ ID NO. 8 es la región variable de la cadena pesada del clon B19 de OX40. Como se muestra en las Figs. 2A, 2B, 3A y 3B, se aislaron varios clones y se sabe que se reconocen específicamente para el antígeno correspondiente en comparación con el control negativo.

40 Subclonación y expresión/purificación del aglutinante específico PD-L1 u OX40 seleccionado como formato de IgG

Para facilitar la detección rápida de un aglutinante específico con funcionalidad en la activación de células T, las cadenas pesadas y ligeras de los aglutinantes positivos contra PD-L1 u OX40 mediante ELISA se amplificaron, digirieron y subclonaron en un vector de expresión de IgG especializado APBio que porta la región constante de IgG4 (SEQ ID NO. 9). Después de la validación de la secuencia, los plásmidos se prepararon y transfectaron en células HEK293 para la expresión de anticuerpos con reactivo de transfección fectina para 293 (Invitrogen). Después de 4 días de cultivo, el anticuerpo secretado en un medio libre de suero se purifica por afinidad a partir del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía de proteína G. Luego se concentra el anticuerpo purificado, seguido de diálisis en tampón de PBS. La concentración final de proteína dializada se determina mediante espectrofotómetro NanoDrop2000 y la pureza e integridad se determinan mediante SDS-PAGE con o sin reactivo reductor como se muestra en las Figs. 4 y 5. La integridad de varios candidatos de anticuerpos purificados, ya sean específicos de PD-L1 o específicos de OX40, es normal en las células HEK293, así como en el anticuerpo de referencia, MPDL3280A para PD-L1 o GSK3174998 para OX40.

En una realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a OX40 (CD134), que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. La región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 6, la SEQ ID NO. 8, aminoácido 128-246 de la SEQ ID NO. 10, y aminoácido 124-241 de la SEQ ID NO. 13. En algunos ejemplos (no cubiertos por las presentes reivindicaciones), la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente. La región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácido 1-108 de la SEQ ID NO. 5, 1-108 de la SEQ ID NO. 7, 1-112 de la SEQ ID NO. 10, y 1-108 de la SEQ ID NO. 13. En algunos ejemplos (no cubiertos por las presentes reivindicaciones), la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente.

(No cubierto por las presentes reivindicaciones) Se describe un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a PD-L1, que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera. El dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 90 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO. 2 y la SEQ ID NO. 4. En algunos ejemplos, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 95 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente. El dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90% de homología con la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácido 1-111 de la SEQ ID NO. 1 y 1-110 de la SEQ ID NO. 3. En algunos ejemplos, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 95 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente.

Determinación de la actividad de unión de candidatos de IgG específicos de PD-L1 y OX40 mediante ELISA directo

Después se aplicaron candidatos de anticuerpos purificados contra PD-L1 u OX40 (candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 o candidatos de anticuerpos anti-OX40) para la caracterización de unión mediante ELISA en PD-L1-Fc o OX40-Fc humano en una configuración recubierta directamente. Las Figuras 6 y 7 mostraron el resultado de unión de ELISA para anticuerpos anti-PD-L1 y anti-OX40, respectivamente. Para los anticuerpos específicos de PD-L1, la mayoría de los candidatos mostraron una actividad de unión similar o mejor con el anticuerpo de referencia (Ab de Ref, MPDL3280A, Roche).

Se dializó la quimera de Fc de IgG 1 de PD-L1 u OX40 humana purificada (PD-L1-Fc u OX40-Fc, APBio) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se ajustó a 1 mg/mL y después se diluyó con PBS hasta una concentración final de 1 µg/mL. Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 0.1 mL por pocillo de quimera recombinante PD-L1-Fc o OX40-Fc, dejando pocillos vacíos para controles de unión no específicos y se incubaron a 4 °C durante la noche. Se eliminó la solución de quimera de PD-L1-Fc o OX40-Fc y las placas se lavaron tres veces con 0.4 mL de tampón de lavado (Tween-20 al 0.1 % en PBS). Se agregaron 0.4 mL de tampón de bloqueo (leche en polvo baja en grasa al 5 % en PBS) a todos los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con mezcla. Se eliminó el tampón de bloqueo y las placas se lavaron tres veces con 0.4 mL de tampón de lavado. Se prepararon diluciones en serie de los anticuerpos de prueba PD-L1 u OX40 en PBS y se agregaron 0.1 mL de Ab diluido por pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó la solución de anticuerpos y las placas se lavaron tres veces con 0.4 mL de tampón de lavado por pocillo. Se diluyó anticuerpo de F(ab')₂ específico de F(ab')₂, de cabra anti-IgG humano marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch # 109-036-097) 1:2000 con PBS y se añadió 0.1 mL por pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con 0.4 mL de tampón de lavado por pocillo. Se agregó 0.1 mL de reactivo TMB (Invitrogen) y se incubó durante 1 a 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 0.05 mL de HCl 1 N y se leyó la absorbancia a 450 nm en un Bio-Tek Spectra. La EC₅₀ calculada para los candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 para PD-L1 mostró que la mayoría de los candidatos poseen una buena actividad de unión, así como MPDL3280A (Ab de Ref) mediante ELISA directo (Fig. 6). Por el contrario, la mayoría de los candidatos de anticuerpos anti-OX40 mostraron una actividad de unión mucho menor en comparación con el anticuerpo de referencia (Ab de Ref, GSK3174998) (Fig. 7).

Determinación de la actividad de unión para candidatos de IgG específicos de PD-L1 y OX40 mediante FACS

También se aplicaron candidatos de anticuerpos purificados (candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 o candidatos de anticuerpos anti-OX40) para citometría de flujo para determinar y comparar la actividad de unión con células HEK293 con expresión de PD-L1 u OX40. Las Figuras 8 y 9 muestran la actividad de unión de los candidatos de anticuerpos correspondientes indicados por FACS con células HEK293 con PD-L1 u OX40 expresadas de forma estable.

Los análisis FACS de células 293 con expresión estable de PD-L1 teñidas con candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 para examinar la actividad de unión de PD-L1, las células de expresión estable se incubaron con 1 µg/mL de candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 purificados, anticuerpo de referencia (Ab de Ref, MPDL3280A) o con anticuerpo isotipo como control negativo en hielo durante 1 hora. Las células se lavaron tres veces con 1x PBS y luego se incubaron con anti-IgG humana de cabra (H+L) conjugada con Alexa-488 (Invitrogen Inc.) en hielo durante 1 hora adicional. Después de la tinción, las células se lavaron tres veces con 1x PBS, se resuspendieron en 1x PBS/FBS al 2% antes de analizarlas mediante FACS Calibur (BD Biosciences, Inc.) y FlowJo (TreeStar, LLC). En el mismo escenario, la actividad de unión de candidatos de anticuerpos anti-OX40 para células HEK293 con OX40 expresado en forma estable en la Fig. 9 también se ejecutó con una estrategia similar y se analizó como se describió anteriormente. Como se muestra en la Fig. 8, la mayoría de los candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 poseen una buena actividad de unión, así como el anticuerpo de referencia. Esto indicó que los clones de fagos seleccionados de la biblioteca OmniMab efectivamente reconocen el PD-L1 nativo en las células.

Este fenómeno también se observa para candidatos de anticuerpos anti-OX40 como se muestra en la Fig. 9. El análisis FACS del clon 2D5 de células 293 con expresión estable de OX40 teñido con candidatos de anticuerpos anti-OX40 purificados para examinar la actividad de unión de OX40, se incubaron células con expresión estable con 2 µg/mL de

Ab de referencia anti-OX40 (ref. de OX40) o Ab de referencia anti-CD137 (ref. de CD137) como anticuerpo de control en hielo durante 1 hora. Las células se lavaron tres veces con 1x PBS y luego se incubaron con anti-IgG humana de cabra (H+L) conjugada con Alexa-488 (Invitrogen Inc.) en hielo durante 1 hora adicional. Después de la tinción, las células se lavaron tres veces con 1x PBS, se resuspendieron en 1x PBS/FBS al 2% antes de analizarlas mediante FACS Calibur (BD Biosciences, Inc.) y FlowJo (TreeStar, LLC).

Unión de competición de ligandos (ensayo ELISA)

Se mostró a los candidatos de anticuerpos el ensayo de selectividad y afinidad de unión usado para evaluar los candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención en cuanto a su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 a PD-1.

Se ensayó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de la quimera PD-L1-Fc humana (PD-L1-Fc) a PD-1/His humana recombinante (hPD-1/His) mediante ELISA. Se dializó hPD-1/His (APBio) recombinante purificada a 1 mg/mL en PBS y luego se diluyó a 5 µg/mL en PBS. Se recubrió una placa de 96 pocillos Nunc Maxisorp con 250 ng de hPD-1/His por pocillo en PBS durante la noche. Se eliminó la solución de hPD-1/His y las placas se lavaron tres veces con 0.4 mL de tampón de lavado (Tween-20 al 0.1 % en PBS). Se agregaron 0.4 mL de tampón de bloqueo (leche en polvo baja en grasa al 5 % en PBS) a todos los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con mezcla. Durante la etapa de bloqueo, las reservas de anticuerpos se diluyeron en un rango de 200 nM a 0 nM en PBS con una dilución en serie de 2 veces. La quimera PD-L1-Fc recombinante purificada se diluyó a 4 µg/mL en PBS. Las placas recubiertas con PD-1/His se lavaron tres veces con 0.2 mL de tampón de lavado (Tween 20 al 0.1 % en PBS). Se añadieron diluciones de anticuerpos de 60 µL (candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 o Ab de Ref MPDL3280A) solas con 60 µL de quimera PD-L1-Fc y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron como se describió anteriormente. Se diluyó anticuerpo específico de Fc, IgG humana con peroxidasa de rábano picante, 1:2000 en PBS, se añadieron 100 µL de la solución resultante a los pocillos de la placa lavada y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron como se describió anteriormente, se agregaron 100 µL de solución de sustrato TMB a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos. La reacción se detuvo con 50 µL de HCl 1 N y se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector Bio-Tek y se muestra en la Fig. 10. Se ha demostrado que los candidatos de anticuerpos parciales inhiben la interacción entre PD-PD-L1 mediante ELISA de competición. La mayoría de los candidatos de anticuerpos revelaron una actividad de bloqueo similar en comparación con el anticuerpo de referencia (Ab de Ref, MPDL3280A).

Estimulación mejorada de la activación de las células T mediante la inhibición de la interacción del ligando PD-1:PD-L1 para el anticuerpo anti-PD-L1

La vía de señalización de PD-1 inhibe las señales coestimuladoras moderadas de TCR/CD28, reduciéndose primero la producción de citocinas sin una disminución en la proliferación de células T. A medida que las señales coestimuladoras de TCR/CD28 se debilitan, domina la vía PD-1, con una gran reducción en la producción de citocinas acompañada de una reducción en la proliferación. Por consiguiente, para confirmar que la inhibición de PD-1 mediante la inhibición de la interacción con PD-L1, los anticuerpos humanos de la invención mejoran la activación de las células T, se realizan reacciones mixtas de linfocitos (MLR).

Se enriquecieron monocitos de sangre completa humana con cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos (Cat. No. 15068) y se cultivaron en medio de diferenciación, RPMI 1640 con FBS al 10 %, 100 ng/mL (1000 U/mL) de GM-CSF, 100 ng/mL (500 U/mL) durante 6 días. La diferenciación de células dendríticas (DC) de monocitos se verificó mediante DC-SIGN-PE, anti-CD14 conjugado con Ab FITC, anti-CD83 conjugado con Ab PE o anti-CD80 conjugado con Ab FITC para validar la diferenciación y solía ser APC en MLR.

Se aislaron células T CD4⁺ alogénicas de sangre completa humana mediante el cóctel de enriquecimiento de células T CD4⁺ humanas RosetteSep™ (Cat. # 15062). La pureza de las células T CD4⁺ se comprobó con Ab APC conjugado con anti-CD4 para garantizar que la pureza sea superior al 95% y luego se marcaron con CFSE 1 µM (kit de proliferación celular de CFSE CellTrace™, Life Technologies, Cat. No. C34554) para ensayo de proliferación de células T. Se usaron células T CD4⁺ marcadas para cultivar conjuntamente con DC inmaduras con diferentes candidatos de anticuerpos como se indica durante 3 y 5 días para ver si los candidatos de anticuerpos podían restaurar la activación de las células T mediante el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L1. Después de 3 y 5 días de incubación, el sobrenadante se recogió para cuantificar citocinas, tal como IL-2 e IFN-γ, mediante ELISA. Se predice que la adición de candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 (clones 6, 32, 28, 51, 64, 27 y 37) a cultivos de células dendríticas inmaduras más células T alogénicas dará como resultado un aumento en la proliferación de células T y citocinas, en comparación con los cultivos tratados con IgG isotipo (iso#1,#2) y se muestra en las Figs. 11A y 11B. La producción de IL-2 e IFN-γ aumenta significativamente en las MLR en comparación con el tratamiento con anticuerpos isotipo después de 3 días (Fig. 11A) o 5 días (Fig. 11B) de tratamiento con anticuerpos, especialmente para el clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1. El incremento de citocinas sigue siendo evidente después de 5 días de tratamiento con anticuerpos y es similar al anticuerpo de referencia (ref), MPDL3280A. Esto indicó que el clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1 debería ser uno de los posibles candidatos para el compuesto de anticuerpos biespecíficos.

Ensayo de actividad agonista del anticuerpo anti-OX40.

Para activar la coestimulación de OX40 de la proliferación de células T y la producción de citocinas, los candidatos de anticuerpos purificados se examinaron funcionalmente para determinar su capacidad para mejorar la producción de citocinas, la proliferación y para inducir la proliferación en células T CD3+ humanas. El anticuerpo anti-CD3 (OKT3, BioLegend Cat. No.317304) y los candidatos de anticuerpos anti-OX40 (clones B6, B70, B120, A4, B17, B19 y B30), el anticuerpo de referencia (GSK3174998) o los anticuerpos de isotipo (iso# 1, #2) se recubrieron en la placa de 96 pocillos Maxisorp. Mientras tanto, se aislaron células T CD3+ humanas sin modificar de la sangre humana de voluntarios adultos utilizando un cóctel de enriquecimiento de células T humanas RosetteSep™ comercialmente disponible (STEMCELL Cat. No.15061) como lo describe el fabricante. Las células T CD3+ aisladas se marcaron luego mediante CFSE (kit de proliferación celular de CFSE CellTrace™, Life Technologies, Cat. No. C34554) y se sembraron a razón de 1×10^6 células/mL en el pocillo recubierto previamente con anticuerpo que contenía medio RPMI 1640, suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2.5 mM para determinar la proliferación celular y la producción de citocinas. Después de 3 días de cultivo, las células se recogieron para un ensayo de proliferación mediante citometría de flujo y luego se analizó el medio para determinar la producción de IL-2 e IFN- γ mediante ELISA de cuantificación.

En la Fig. 12A se muestra la detección de candidatos de anticuerpos anti-OX40 con actividad agonista en la activación de células T. Todos los candidatos de anticuerpos anti-OX40 mostraron la capacidad de mejorar la activación de las células T CD3+ con respuesta a la dosis, así como el anticuerpo de referencia. El tratamiento con dosis más altas de anticuerpos mostró obviamente una mayor actividad de activación de células T. Mientras tanto, la producción de citocinas (Fig. 12B), tales como IL-2 e IFN- γ , también reveló una respuesta de activación de células T similar, especialmente para el clon principal B17 del candidato de anticuerpo anti-OX40. La citocina es altamente inductora después del tratamiento de 3 días con el clon B17 candidato del anticuerpo anti-OX40. La mejora es mucho mayor que la del tratamiento con anticuerpos de referencia; este clon B17 implicado debería ser uno de los candidatos para la construcción de anticuerpos biespecíficos.

Como los datos mostrados en las Figs. 13A y 13B, ambos candidatos de anticuerpos anti-OX40, clones B17 y B19, mostraron una mejor actividad agonista en el ensayo después de 3 días de tratamiento con candidatos de anticuerpos anti-OX40 (B17 o B19). Tanto la producción de IL-2 como la producción de IFN- γ muestran una mejora obvia tras el tratamiento con anticuerpos y revelaron una correlación dependiente de la función. Se registraron producciones más altas de citocinas en el tratamiento con dosis más altas de anticuerpos.

Para evaluar la actividad agonística de los candidatos de anticuerpos OX40, B17 y B19, también se determinó la EC50, así como el ensayo de actividad agonística y la producción de citocinas se registraron para comparación.

Construcción, expresión y purificación del anticuerpo scFv anti-PD-L1-OX40

Dado que el biespecífico está diseñado como un formato basado en IgG fusionado con scFv, la estructura del anticuerpo anti-punto de control inmunitario Fc fusionado terminalmente con scFv de OX40. El anticuerpo puede ser anticuerpos inhibidores de puntos de control antiinmunes, tales como anti-PD-L1, anti-PD-1, anti-CTLA4, anti-LAG3, etc., o anticuerpos estimuladores, tales como anti-CD28, anti-CD137, anti-CD27, anti-ICOS, etc. Se coloca un enlazador entre el anticuerpo Fc y el scFv de OX40 para generar el anticuerpo biespecífico como se representa en la Fig. 14.

En alguna realización, el clon 6 candidato de anticuerpo anti-PD-L1 se asigna a la forma IgG, por otro lado, el candidato de anticuerpo anti-OX40 se transformaría como formato de scFv para fusionarse en el extremo terminal C de la región Fc en el clon 6 del candidato de anticuerpo anti-PD-L1. La transformación del anticuerpo al formato de scFv podría dar como resultado la reducción de la actividad o especificidad de unión; por lo tanto, se usaron varios candidatos de anticuerpos anti-OX40 para la transformación de scFv. Construcción Fc de anticuerpo anti-PD-L1 bifuncional fusionado con scFv de OX40 de longitud completa (SEQ ID NO. 10 como clon A4, SEQ ID NO. 11 como clon B17, SEQ ID NO. 12 como clon B19 o SEQ ID NO. 13 como clon B120). Se colocó un enlazador peptídico flexible corto, (GGGG)₂ (SEQ ID NO. 14), por ejemplo, entre el extremo terminal C de la cadena pesada del anticuerpo anti-PD-L1 de la región Fc y el módulo del extremo N terminal de scFv de OX40 para asegurar el plegamiento correcto y minimizar el impedimento estérico. Las secuencias codificantes de los anticuerpos de scFv anti-PD-L1-OX40 se muestran en la SEQ ID NO. 16 (scFv del clon B17 de OX40 de cadena pesada del clon 6 anti-PD-L1) y NO. 17 (scFv del clon B19 de OX40 de cadena pesada del clon 6 anti-PD-L1). Las proteínas de fusión de Fc del anticuerpo construido fueron lideradas por un péptido señal (SEQ ID NO. 15) y expresadas por células de mamífero, y purificadas a partir del sobrenadante del cultivo celular transfectado mediante cromatografía de proteína G de 1 etapa. Como se muestra en la Fig. 15, se puede obtener una pureza superior al 90 % en un proceso de purificación de una sola etapa y muestra que las proteínas de fusión purificadas tienen el peso molecular correcto (Mw = 220 kD).

Estimulación mejorada de la activación de células T para candidatos de anticuerpos biespecíficos de scFv anti-PD-L1-OX40 en MLR

Para determinar la cooperación sinérgica del anticuerpo biespecífico para mejorar la activación de las células T mediante la inhibición de la interacción entre PD-1 y PD-L1 y la activación agonística de la señalización de OX40, se aplicaron los candidatos de anticuerpos biespecíficos, scFv anti-PD-L1-OX40, en MLR como se describió

anteriormente. Luego se registró la producción de IL-2 e IFN- γ después de 3 o 5 días de tratamiento con anticuerpos. Se aplicó anticuerpo mono, combinado o biespecífico en cantidades iguales o moles iguales para comparar el efecto sinérgico en la mejora de la activación de las células T y se usó el IgG isotipo como control negativo. Como muestran los datos en las Figs. 16A y 16B, los candidatos de anticuerpos anti-PD-L1 solos mostraron una inducción significativa de IL-2 después de 3 días de tratamiento, así como el anticuerpo de referencia, MPDL3280A; por el contrario, los candidatos de anticuerpos anti-OX40 no pueden aumentar obviamente la sobreexpresión de la producción de citocinas, ya sea después de 3 días o 5 días de tratamiento con anticuerpos. Esto se basa en el anticuerpo de referencia, GSK3174998. Sin embargo, la combinación de anticuerpos anti-OX40 y anticuerpos anti-PD-L1 mostró una sobreexpresión significativa de la producción de citocinas después de 3 y 5 días de tratamiento con anticuerpos. El efecto sinérgico también se observa en el tratamiento de candidatos de anticuerpos biespecíficos y el incremento de la producción de citocinas es similar al tratamiento combinado. Esto indicó que los candidatos de anticuerpos biespecíficos de scFv anti-PD-L1-OX40 también funcionan como tratamiento de combinación de anticuerpos sin pérdida de ninguna actividad de unión en la transformación scFv.

15 Determinación de agregación y pureza de anticuerpos biespecíficos.

Dado que el Ab de scFv del clon 6 anti-PD-L1-clon B17 de OX40 reveló una pureza inferior (74.07 %) mediante análisis de SEC-HPLC después de una purificación por cromatografía de proteína A en una sola columna, por lo tanto, se generaron varias variantes de anticuerpos para mejorar la pureza y reducir la agregación del anticuerpo biespecífico en la presente invención. Los enlazadores descritos como anteriormente se usaron para reemplazar el enlazador en scFv de B17 de OX40 en el anticuerpo biespecífico, Ab anti-PD-L1-OX40 (SEQ ID NO. 16), y se produjeron como Ab-V1 a V4 anti-PD-L1-OX40 (SEQ ID NO. 18 a SEQ ID NO. 21) en las células CHO. Luego, esas variantes se purificaron y analizaron mediante una columna de SEC-HPLC XBridge Protein BEH (Waters, Cat. No. 186007640). Los datos se resumieron como se muestra a continuación en la Tabla 1, una de las variantes de anticuerpo biespecífico, Ab-V4 anti-PD-L1-OX40, reveló una mejora significativa de la pureza del anticuerpo. La pureza aumenta del 74.07 al 92.27%. Por lo tanto, se utilizó Ab-V4 anti-PD-L1-OX40 para modificar aún más para mejorar la pureza del anticuerpo.

Tabla 1. Diferentes enlazadores en scFv de B17 de OX40

Abreviatura	Cadena pesada/cadena ligera	Enlazador en scFv de B17 de OX40	Referencia
Ab anti-PD-L1-OX40	Anti-PD-L1-6-OX40 B17 scFv-L1 HC/ Anti-PD-L1 6 LC	GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 39)	Int. J. Mol. Sci. 2014, 15(12), 23658-23671
Ab-V1 anti-PD-L1-OX40	Anti-PD-L1-6-OX40 B17 scFv-L2 HC/ Anti-PD-L1 6 LC	SSGGGGSGGGGGSS RSSL (SEQ ID NO: 40)	Ninguna
Ab-V2 anti-PD-L1-OX40	Anti-PD-L1-6-OX40 B17 scFv-L3 HC/ Anti-PD-L1 6 LC	GGKGS GGKGTGGKGS GGKGS (SEQ ID NO: 41)	Virol J. 2008; 5:21
Ab-V3 anti-PD-L1-OX40	Anti-PD-L1-6-OX40 B17 scFv-L4 HC/ Anti-PD-L1 6 LC	GSASAPTLFPLVS (SEQ ID NO: 42)	DOI: 10.3892/mmr.2013.1502
Ab-V4 anti-PD-L1-OX40	Anti-PD-L1-6-OX40 B17 scFv-L5 HC/ Anti-PD-L1 6 LC	GSTSGSGKPGSGEGS TKG (SEQ ID NO: 43)	PMID: 8309948

30 Para caracterizar la distribución de tamaños de anticuerpos biespecíficos, las muestras se cargaron en una columna de SEC-HPLC XBridge Protein BEH (Waters, de Cat. No. 186007640) utilizando un módulo de separaciones Waters Alliance 2695. El pico de proteína se detectó a 280 nm utilizando un detector de PDA Water 2996. La fase móvil fue fosfato de sodio isocrático 25 mM (Sigma, Cat. No. 04272 y Cat. No. 04269) con NaCl 200 mM (AMRESCO, Cat. No. 0241), pH 6.8, a un caudal de 0.4 mL/min. Los porcentajes de pico se determinaron por las porciones del área de pico como se muestra en las Figs. 17A a 17E.

Ab-V4 anti-PD-L1-OX40 reveló una mejora significativa de la pureza (Fig. 17E). El anticuerpo biespecífico se modificó adicionalmente en el fragmento scFv de B17 de OX40 para mejorar nuevamente la pureza. Varios residuos en el scFv de B17 de OX40 mostrado en la Fig. 18 se sustituyeron con aminoácidos diferentes y las variantes de cadena pesada se emparejaron con la cadena ligera del clon 6 anti-PD-L1 para generar varias variantes de anticuerpos biespecíficos, a partir de Ab.-V5 a V12 anti-PD-L1-OX40 (SEQ ID NO. 22 a SEQ ID NO. 29), y luego se expresaron y purificaron como se mencionó anteriormente. La pureza de las variantes de anticuerpos biespecíficos se resumió como se muestra a continuación en la Tabla 2; el scFv-V5 anti-PD-L1-OX40 reveló la mejor pureza en esas variantes de

anticuerpos. La pureza se eleva hasta el 96.46%. Esto mostró una pureza superior para el anticuerpo biespecífico modificado y también reveló una buena capacidad de desarrollo para este anticuerpo biespecífico en el futuro. Como se muestra en la Fig. 19, la integridad del Ab-V5 anti-PD-L1-OX40 también se analizó mediante SDS-PAGE y mostró una buena integridad en condiciones reductoras y no reductoras.

5

Tabla 2. Pureza del anticuerpo

Anticuerpo	Pureza por SEC-HPLC (%)
Ab-V4 anti-PD-L1-OX40	92.27
Ab-V5 anti-PD-L1-OX40	96.46
Ab-V6 anti-PD-L1-OX40	86.36
Ab-V7 anti-PD-L1-OX40	88.04
Ab-V8 anti-PD-L1-OX40	90.00
Ab-V9 anti-PD-L1-OX40	87.89
Ab-V10 anti-PD-L1-OX40	86.56
Ab-V11 anti-PD-L1-OX40	86.61
Ab-V12 anti-PD-L1-OX40	84.78

Mientras tanto, las variantes de anticuerpos biespecíficos modificadas también se aplicaron para la evaluación de la actividad de unión para PD-L1 y OX40 humanos mediante ELISA directo como se muestra en la Fig. 20. Todas las variantes de anticuerpos biespecíficos indicadas mostraron la misma actividad de unión para PD-L1 humano (Fig. 21), esta actividad de unión es similar con el anticuerpo anti-PD-L1 6. Este fenómeno también se observó en el ensayo de unión de OX40 humano (Fig. 22). Solo el Ab-V10 anti-PD-L1-OX40 mostró una actividad de unión más débil para el OX40 humano en comparación con otras variantes. Indicó que la modificación de scFv de OX40 no afecta la actividad de unión de OX40. La actividad de unión se conserva para PD-L1 u OX40. Dado que el Ab-V5 anti-PD-L1-OX40 reveló una pureza de anticuerpo superior y una actividad de unión para PD-L1 y OX40, se eligió el Ab-V5 anti-PD-L1-OX40 por su estabilidad en el suero.

10

15

Estabilidad en suero *ex vivo*

La estabilidad se evaluó en suero humano (BioreclamationIVT, Cat. No. HMSRM), así como en suero de especies preclínicas relevantes: mono rhesus (BioreclamationIVT, Cat. No. RHSSRM), y ratón CD1 (BioreclamationIVT, Cat. No. MSESRM). Las muestras se agregaron a suero de diferentes especies hasta una concentración final de 15 µg/mL y se incubaron en un baño de agua a 37 °C. Se recogieron muestras de suero después de tiempos de incubación de 0, 1, 2, 3, 7, 10 y 14 días y se almacenaron congeladas a -80 °C hasta su análisis.

20

25

Cuantificación de ELISA tipo sándwich

Se recubrió OX40-Fc en una placa de ELISA (NUNC, Cat. No. 442404) con 100 µL a razón de 1 µg/mL en PBS y se incubó durante la noche a 4 °C. El tampón de lavado se preparó como PBS con Tween-20 al 0.1 % (Sigma, Cat. No. P2287-500 mL) y el tampón de bloqueo se preparó como BSA al 1 % (UniRegión, Cat. No. UR-BSA001-100G) en tampón de lavado. Las muestras de suero se prepararon con una dilución de 10 veces con una dilución en serie de 3x en tampón de bloqueo y los estándares se prepararon a 10 nM con una dilución en serie de 3x en tampón de bloqueo. El PD-L1-Fc biotinilado se marcó con el kit de conjugación Biotin Fast (Abcam, Cat. No. ab201796) utilizando un protocolo estándar y se preparó a 30 nM en tampón de bloqueo. Se preparó estreptavidina-HRP (Abcam, Cat. No. ab7403) a razón de 1 µg/mL en tampón de bloqueo. Todas las muestras se agregaron a cada pocillo para 100 µL después de que las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Desarrollo de TMB con 100 µL de solución de TMB (Invitrogen, Cat. No. 00-2023) durante 2 minutos y se detuvo con 100 µL de solución de HCl 1 N (Merck, Cat. No. 1.00317.1000). La absorción a una OD de 450 nm se leyó mediante un lector de ELISA (Biotek, Powerwave XS).

30

35

40

Se eligió Ab-V5 anti-PD-L1-OX40 para la estabilidad en suero *ex vivo* debido a su pureza superior y actividad de unión para PD-L1 y OX40. Los anticuerpos biespecíficos purificados se mezclaron con suero de diferentes especies, tal como humana, ratón o mono. Después de varios días de cultivo, las muestras se tomaron y analizaron mediante ELISA tipo sándwich para determinar la cantidad de anticuerpos. Como se muestra en la Fig. 23, el Ab-V5 anti-PD-L1-OX40 todavía mostró una buena estabilidad en suero después de 14 días de cultivo a 37 °C. La concentración del anticuerpo sigue siendo superior al 70%, ya sea en humanos, ratones o monos. Está indicado que el anticuerpo también tiene una buena estabilidad en suero.

45

Para medir la capacidad del Ab-V5 anti-PD-L1-OX40 para modular la capacidad de respuesta de las células T, las células T purificadas se cultivarán con células dendríticas alogénicas, preparadas cultivando monocitos en GM-CSF e IL-4 durante unos días. Se configuraron placas paralelas para permitir la recolección de sobrenadantes el día 3 y el día 5 para medir IL-2 e IFN-γ respectivamente usando un kit ELISA comercial. Como mostraron los datos en las Fig. 24A y 24B, la producción de IL-2 e IFN-γ está altamente sobre regulada en el tratamiento con anticuerpos biespecíficos (V5), así como en el tratamiento combinado después de 3 o 5 días de tratamiento con anticuerpos. Además, la mejora

50

es obviamente superior al tratamiento con Ab anti-PD-L1 o Ab anti-OX40 solos. Esto implicaba que el anticuerpo biespecífico modificado, V5, todavía posee la actividad agonista, así como el tratamiento combinado sin pérdida de funcionalidad y podría desarrollarse como un anticuerpo terapéutico para diversos tumores sólidos o cánceres en el futuro.

5 Actividad antitumoral del anticuerpo biespecífico (modelo *in vivo*)

La falta de reactividad cruzada en roedores de PD-L1 y OX40 en anticuerpos biespecíficos impidió el uso de modelos tumorales de xenoinjerto humano o singénico murino estándar para la evaluación de la eficacia de los anticuerpos

10 contra tumores humanos. En consecuencia, se generó un nuevo modelo de ratón con tumor xenogénico huPBL-SCID-Bg utilizando un ratón SCID-Bg (CB.17/lcr.Cg Prkdc^{scid}Lyst^{tg}/CrI), que alberga linfocitos T y B murinos que carecen de la mutación beige (Bg) y células NK funcionales. La eficacia antitumoral humana de los anticuerpos biespecíficos se evaluó utilizando este modelo como se describe a continuación.

15 La próstata humana PC-3 se obtuvo de la American Type Culture Collection y se cultivó en RPMI-1640 (Invitrogen) con L-glutamina, piruvato sódico, penicilina/estreptomicina y suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS, Gibco Cat. No. 10437). Las células se cultivaron hasta confluencia en matraces Falcon T-150. Posteriormente, las células se tripsinizaron (tripsina 0.25% -EDTA; Invitrogen) y el crecimiento se amplió hasta un número de células suficiente para la inoculación. Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada usando Lymphoprep™ de acuerdo con el protocolo del fabricante (STEMCELL Technologies Inc.). Las suspensiones de células contadas se combinaron de manera que cada ratón recibió una inyección de 0.75×10^6 PBMC y 3×10^6 células tumorales en una única inyección en bolo de 0.1 mL en PBS. Para facilitar el crecimiento de las células tumorales en el ratón, se mezclaron otros 0.1 mL de matrigel con la suspensión celular combinada y luego se inyectó

20 inmediatamente en los ratones preparados.

25 Para cada ratón, se inyectaron por vía subcutánea 0.2 mL de volumen de la suspensión celular combinada en el flanco derecho del animal. Después de 14 días de inoculación, se forma el tumor sólido y alcanza alrededor de 250 a 300 mm³ y el anticuerpo biespecífico (3 mg/kg de Ab-V5 anti-PD-L1-OX40), anticuerpo de referencia PD-L1 (Ab de Ref, MPDL3280A) o el anticuerpo de control (isotipo) se reata dos veces por semana durante tres semanas con inyección intraperitoneal (i.p.). La medición del tumor se realizó mediante un calibrador Pressier dos veces por semana, así como la administración de la muestra de prueba durante la duración de los experimentos y también se registraron los pesos corporales. El volumen del tumor se calculó usando el siguiente cálculo: largo X ancho² X 0.44 = volumen (mm³) y se representó en la Fig. 25. Los ratones fueron retirados del estudio en el caso de que el volumen del tumor alcanzara 2000 mm³ o que el animal perdiera el 20 % de su peso corporal antes de terminar el experimento. Se observaron resultados similares cuando se midieron los tumores el día 7 después de la inoculación y los animales se dividieron

30 aleatoriamente de acuerdo con el volumen del tumor. Para el estudio con animales, cada grupo estaba formado por 6 ratones. Como muestran los datos en la Fig. 25, el anticuerpo biespecífico mostró una eficacia antitumoral significativa en el modelo de ratón xenoinjertado con PC-3. El tamaño del tumor se reduce 18 días después de la inoculación del tumor, así como del anticuerpo de referencia PD-L1, y continúa reduciéndose por debajo de 100 mm³. Se demostró preliminarmente que el modelo de ratón xenoinjertado con PC-3 es un anticuerpo biespecífico antitumoral y se reveló su potencial para ser un candidato a fármaco terapéutico en el futuro.

35 En conjunto, estos resultados indicaron que el anticuerpo biespecífico mantiene el bloqueo de su punto de control inmunitario en la señalización de PD-1/PD-L1 y su actividad agonística para la señalización de OX40. Se están llevando a cabo estudios para investigar más a fondo la actividad biológica de estas proteínas utilizando un modelo animal adecuado, tal como el tumor PC-3 en el modelo NOD.Cg-Prkd^{scid}Il2rg^{tmLwjl}/SzJ (NSG) humanizado.

40 La región Fc en la presente invención podría ser de cualquier isotipo, subclase, alotipo o mutante modificado de inmunoglobulina, tal como fragmento(s) Fc de botón y ojal.

50 Ejemplos

El siguiente ejemplo describe la generación de anticuerpos monoclonales adecuados para fines terapéuticos dirigidos a PD-L1 y OX40 humanos. Se generaron anticuerpos compuestos humanos anti-PD-L1 humano y anti-OX40 a partir

55 del clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1 y del clon B17 del anticuerpo anti-OX40, respectivamente. Los segmentos de la secuencia de la región V humana se obtuvieron de bases de datos de secuencias de anticuerpos humanos no relacionados (línea germinal y no germinal).

60 Ejemplo 1. Generación de anticuerpos de IgG que se unen a PD-L1 y OX40

Ciertos anticuerpos proporcionados por la presente invención se generaron originalmente a partir de la unión de Fab a PD-L1 u OX40 humano. Los Fab se seleccionaron de una biblioteca de presentación en fagos, la biblioteca de fagémidos OmniMab, luego de una selección alterna de las proteínas de fusión Fc correspondientes (PD-L1-Fc u OX40-Fc) y células que expresan la proteína humana correspondiente (PD-L1 u OX40). Después de la detección por

65 ELISA directo o ELISA basado en células, los clones positivos se secuenciaron para determinar la cadena pesada y la cadena ligera. Estos Fab incluían aquellos que están designados como "OM-PD-L1-6" y "OM-PDL1-32", etc. para

PD-L1; "OM-OX40-A4", "OM-OX40-B17" y "OM-OX40-B19", etc. para OX40. Los anticuerpos de PD-L1 PD-L1-Clon 3, PD-L1-Clon 6 y PD-L1-Clon 32 divulgados en esta solicitud se generaron a partir de "OM-PD-L1-6" y "OM-PDL1-32". Mientras tanto, los candidatos de anticuerpos de OX40 OX40-A4, OX40-B17 y OX40-B19 divulgados en esta solicitud se generaron a partir de "OM-OX40-A4", "OM-OX40-B17" y "OM-OX40-B19" en células HEK293 o células CHO-S. Y el anticuerpo biespecífico dirigido a PD-L1 y OX40 simultáneamente se diseñó como anticuerpo de B17 de scFv anti-PD-L1 6-OX40 y anticuerpo B19 de scFv anti-PD-L1 6-OX40. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un Fab dado son idénticas a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada, respectivamente.

10 Ejemplo 2. Unión *in vitro* de scFv anti-PD-L1-OX40 a su diana correspondiente

Se construyó el anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-OX40 como se muestra en la Fig. 14 y se expresó en las células HEK293 o células CHO-S. El medio que contenía el anticuerpo biespecífico se purificó por afinidad a partir del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía con proteína G. Luego se concentra el anticuerpo purificado, seguido de diálisis en tampón de PBS y se analiza mediante SDS-PAGE como se muestra en la Fig. 15. Para probar la unión directa de proteínas de fusión purificadas a PD-L1 u OX40 en ELISA, se recubrieron 100 ng/pocillo de PD-L1 u OX40 recombinante en una placa ELISA de 96 pocillos. Luego se agregaron a cada pocillo varias concentraciones de scFv anti-PD-L1-OX40 purificado y se incubaron durante 1 hora. Después del lavado, se añadió a cada pocillo una dilución 1:5000 de conjugado anti-Fab con HRP (Jackson Immunochemicals) y se incubó durante otra hora. Después del lavado final, se añadió sustrato TMB (Invitrogen Inc.) y se midió la absorbancia de OD a 450 nm. Se calculan los datos analizados mediante ajuste de curva sigmoidea utilizando GraphPad Prism 5 y EC50.

Ejemplo 3. Especificidad de unión al antígeno de scFv anti-PD-L1-OX40 mediante análisis FACS

25 Para probar la especificidad de unión del anticuerpo de scFv anti-PD-L1-OX40, se tiñeron células 293, de expresión estable de PD-L1, A549 o WiDr estimuladas con IFN- γ con 1 μ g/mL de anticuerpo de scFv anti-PD-L1-OX40 durante 1 hora en hielo antes de lavar tres veces con 1x PBS. Las proteínas de fusión de anticuerpos unidas se detectaron con anti-IgG humana de cabra (H+L) conjugada con Alexa-488 seguido de análisis FACS. Se utilizó anticuerpo isotipo como control negativo para la prueba. Los resultados mostraron que el scFv anti-PD-L1-OX40 mantiene su especificidad de unión al antígeno en comparación con el anti-PD-L1 solo. La especificidad de unión del anticuerpo de scFv anti-PD-L1-OX40 también se probó utilizando células 293 de expresión estable de OX40.

Ejemplo 4. Efecto inmunomodulador *in vitro* de proteínas bifuncionales

35 Para medir la capacidad de los anticuerpos de scFv anti-PD-L1-OX40 para modular la capacidad de respuesta de las células T, las células T purificadas se cultivarán con células dendríticas alogénicas, preparadas cultivando monocitos en GM-CSF e IL-4 durante unos días. Se configuraron placas paralelas para permitir la recolección de sobrenadantes el día 3 y el día 5 para medir IL-2 e IFN- γ respectivamente usando un kit ELISA comercial. El anti-PD-L1 humanizado de Genentech/Roche, MPDL3280A, se producirá internamente y se utilizará como control positivo. Como muestran los datos en las Figs. 16A y 16B, la producción de IL-2 e IFN- γ está altamente sobre regulada en el tratamiento con anticuerpos biespecíficos así como en el tratamiento combinado después de 3 o 5 días de tratamiento con anticuerpos. Especialmente, el anticuerpo biespecífico compuesto por el clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1 y el clon B17 del anticuerpo anti-OX40 (ab de B17 de scFv anti-PD-L1-OX40) o una combinación (Ab del clon 6 anti-PD-L1 más Ab del clon B17 anti-OX40) mostró que la mejora de la activación de las células T es mayor que la combinación de PD-L1 y OX40 de referencia (Ab de Ref de PD-L1 más Ab de Ref de OX40). Esto indicó que el anticuerpo de B17 anti-OX40 puede poseer una unión de epítipo especial para dar como resultado una mejor actividad agonista en comparación con el anticuerpo OX40 de referencia, GSK3174998.

Ejemplo 5. Expansión de leucocitos humanos inducida por anticuerpos biespecíficos *in vivo*

50 La falta de reactividad cruzada detectable de los anticuerpos PD-L1 u OX40 con PD-L1 u OX40 murino y el requisito de la presencia de células inmunes humanas requirió el desarrollo de modelos para la evaluación funcional *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos. Los ratones con antecedentes genéticos NOD que portan la mutación de inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y la deficiencia en la cadena gamma común del receptor de IL-2 (comúnmente denominada NSG) son capaces de soportar el injerto de una gran cantidad de leucocitos de sangre periférica humana (huPBL) y mantener injerto durante al menos 30 días (King et al., 2008). Este modelo de ratón, también conocido como modelo huPBL-NSG, se utilizó para evaluar el efecto funcional de la administración sistémica *in vivo* de los anticuerpos en las células inmunes humanas.

60 Específicamente, se transfirieron adoptivamente 6 millones de PBMC humanas recién aisladas mediante inyección intravenosa a ratones huPBL-NSG. Nueve días después de las inyecciones de PBMC, a los animales se les administró una dosis única de 1 mg/kg de monoanticuerpo, anticuerpo biespecífico o anticuerpo de control de isotipo IgG4 mediante inyección intraperitoneal. En los días 24 a 28 después del injerto de PBMC, las PBMC se tiñeron con anticuerpos contra CD45 humano y murino evaluados mediante citometría de flujo. Se utilizaron perfiles de dispersión frontal y lateral para determinar la puerta de linfocitos. Los anticuerpos biespecíficos pudieron mejorar la expansión de

los leucocitos humanos, como lo demuestra el aumento de la proporción de células CD45+ humanas en la sangre periférica de los ratones injertados. Para cada grupo, $n \geq 6$ ratones.

5 Ejemplo 6. Inhibición del crecimiento de células tumorales PC-3 o A498 en huPBL-NSG mediante anticuerpo scFv anti-PD-L1-OX40

10 Se puede utilizar la línea celular de cáncer de próstata humano positiva para PD-L1, PC-3 (ATCC # CRL-1435) o la línea celular de cáncer de riñón, A498 (ATCC® HTB-44™) para establecer modelos de xenoinjerto en ratones huPBL-NSG. Para la formación de tumores, se inyectarán por vía subcutánea 3×10^6 células PC-3 (o células A498)/ratón en ratones huPBL-NSG como se describió anteriormente. Para evaluar los efectos inhibidores sobre el crecimiento del tumor, se administrarán por vía intravenosa diferentes concentraciones de anticuerpo scFv anti-PD-L1-OX40, anticuerpo de referencia o anticuerpo isotipo de 0.1 a 3 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas en los ratones después de 14 días de implantación de células tumorales. El crecimiento del tumor se medirá dos veces por semana hasta 5 semanas como se describe en el modelo de ratones Fox Chase SCID®Beige.

15 Ejemplo 7. Evaluación farmacocinética de scFv anti-PD-L1-OX40 en ratones y monos

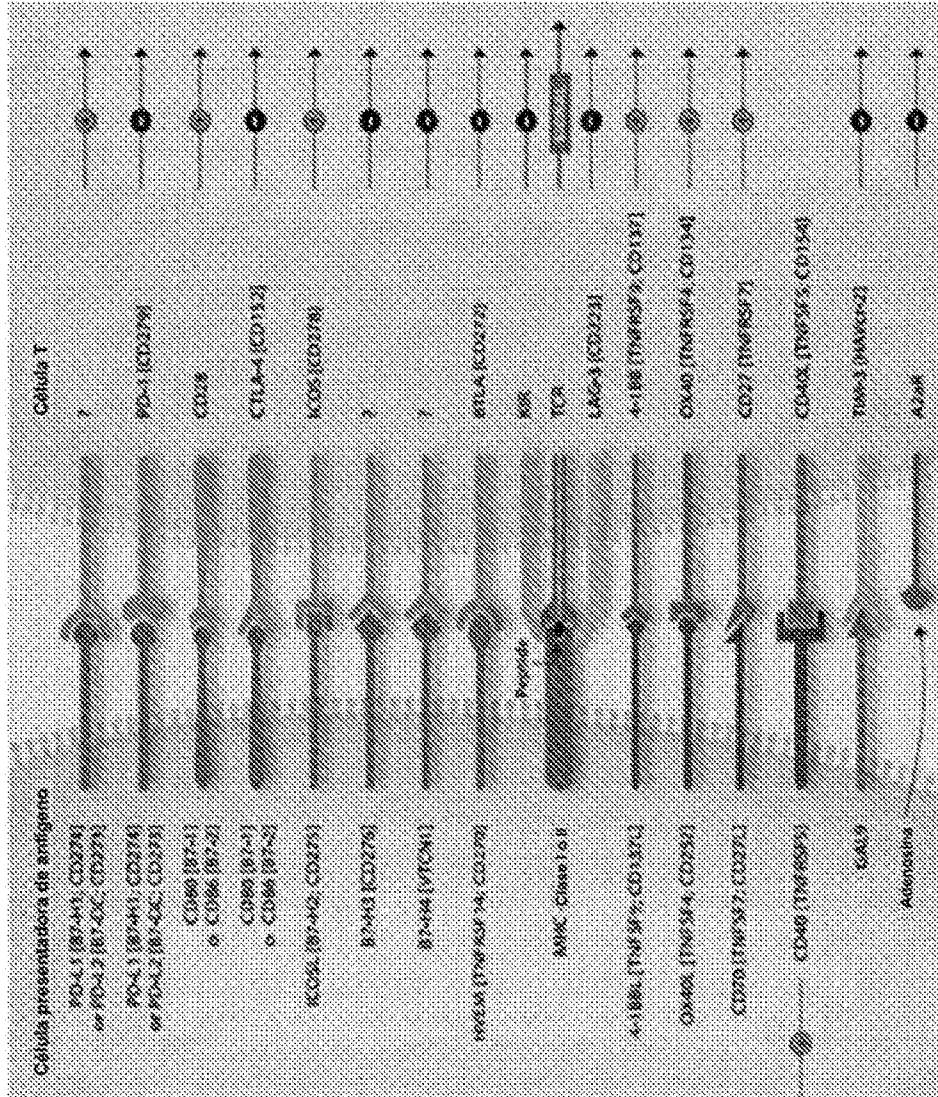
20 Se administrarán 10-40 mg/kg de proteínas bifuncionales, scFv anti-PD-L1-OX40 en ratones o monos mediante inyección subcutánea o inyección intravenosa. Se tomarán muestras de suero en diferentes momentos después de la inyección hasta 15 días. Las concentraciones de la proteína de fusión Fc en las muestras de suero se determinarán mediante un ensayo ELISA tipo sándwich.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a OX40 (CD134), que comprende:
- 5 una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden respectivamente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) SEQ ID NO. 6 y aminoácido 1-108 de la SEQ ID NO. 5,
 (ii) SEQ ID NO. 8 y 1-108 de la SEQ ID NO. 7,
 10 (iii) aminoácido 128-246 de la SEQ ID NO. 10 y 1-112 de la SEQ ID NO. 10, y
 (iv) aminoácido 124-241 de la SEQ ID NO. 13 y 1-108 de la SEQ ID NO. 13
2. El anticuerpo o su porción de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o su porción de unión a antígeno es una secuencia de fragmento variable de cadena única (scFv) seleccionada del grupo que consiste en
 15 las SEQ ID NOS. 10, 11, 12 y 13.
3. El anticuerpo o su porción de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o su porción de unión a antígeno es un anticuerpo biespecífico.
- 20 4. El anticuerpo o su porción de unión a antígeno de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un sitio de unión a proteína de punto de control inmunitario.
5. El anticuerpo o su porción de unión a antígeno de la reivindicación 4, en el que el sitio de unión a la proteína de punto de control inmunitario comprende un sitio de unión al ligando de la proteína 1 de muerte celular programada
 25 (PD-L1), un sitio de unión a PD-1, un receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) un sitio de unión al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), un sitio de unión al antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) o un sitio de unión al gen 3 de activación de linfocitos (LAG3).
6. Un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a OX40 y PD-L1, comprendiendo el anticuerpo biespecífico al menos una cadena polipeptídica, en el que el anticuerpo biespecífico comprende:
- 30 (a) un sitio de unión a OX40, que comprende:
 una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden respectivamente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 35 (i) la SEQ ID NO. 6 y el aminoácido 1-108 de la SEQ ID NO. 5,
 (ii) la SEQ ID NO. 8 y 1-108 de la SEQ ID NO. 7,
 (iii) aminoácido 128-246 de la SEQ ID NO. 10 y 1-112 de la SEQ ID NO. 10, y
 40 (iv) aminoácido 124-241 de la SEQ ID NO. 13 y 1-108 de la SEQ ID NO. 13; y
- (b) un sitio de unión a PD-L1, que comprende:
 un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que comprenden respectivamente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 45 (i) la SEQ ID NO. 2 y el aminoácido 1-111 de la SEQ ID NO. 1, y
 (ii) SEQ ID NO. 4 y 1-110 de la SEQ ID NO. 3.
7. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 6, en el que la cadena polipeptídica comprende además:
 50 un dominio Fc;
 un fragmento Fab conectado al extremo terminal N del dominio Fc, y el fragmento Fab que comprende el sitio de unión de PD-L1; y
 un scFv conectado al extremo terminal C del dominio Fc, y el scFv que comprende el sitio de unión de OX40.
8. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 7, en el que la cadena polipeptídica comprende además un enlazador
 55 entre el dominio Fc y el scFv.
9. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 8, en el que el scFv comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en aminoácido 455-707 de la SEQ ID NO. 18, 455-708 de la SEQ ID NO. 19,
 60 455-701 de la SEQ ID NO. 20, 455-706 de la SEQ ID NO. 21, 455-706 de la SEQ ID NO. 22, 455-706 de la SEQ ID NO. 23, 455-706 de la SEQ ID NO. 24, 455-706 de la SEQ ID NO. 25, 455-706 de la SEQ ID NO. 26, 455-706 de la SEQ ID NO. 27, 455-706 de la SEQ ID NO. 28, y 455-706 de la SEQ ID NO. 29.
10. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo biespecífico comprende un par de cadenas polipeptídicas.
- 65

11. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 10, en el que el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY.
- 5 12. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 11, en el que el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG.
13. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 12, en el que el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 10 14. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer, que comprende el anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 15. La composición farmacéutica para el uso de la reivindicación 14, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), melanoma, linfoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales (RCC) y cáncer de ovario.
16. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o su porción de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 17. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13.

Fig 1



PD-L1

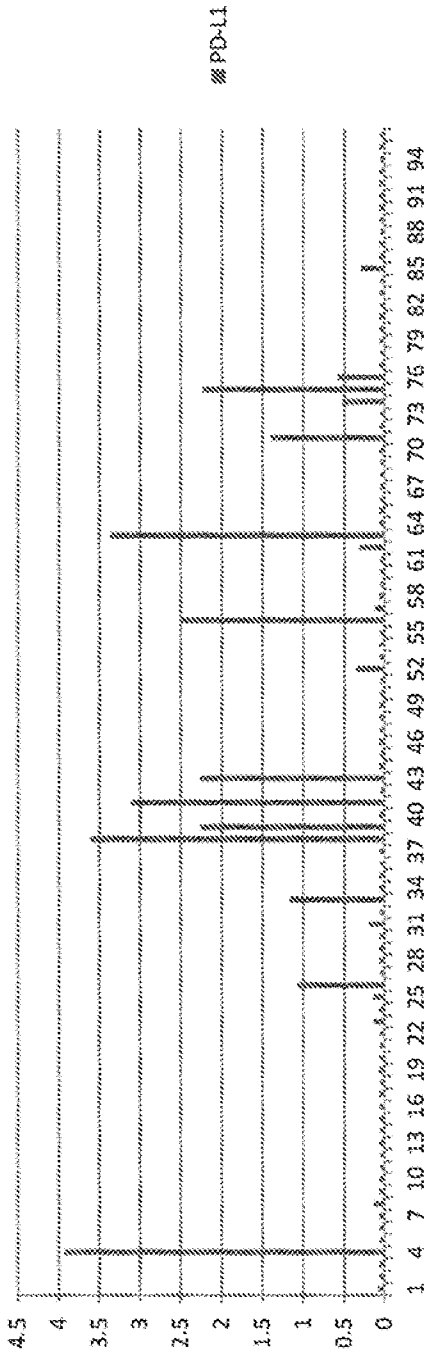


Fig. 2A

control

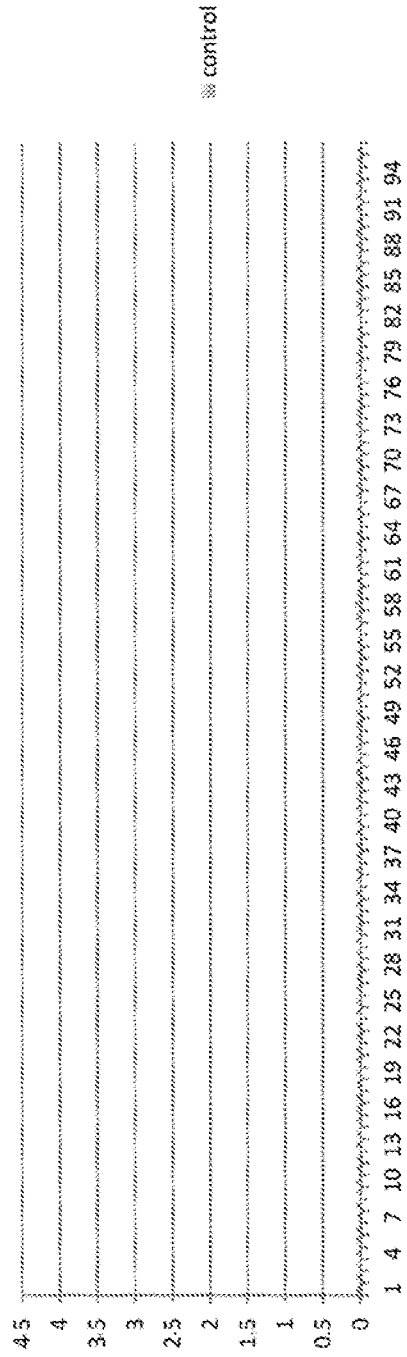


Fig. 2B

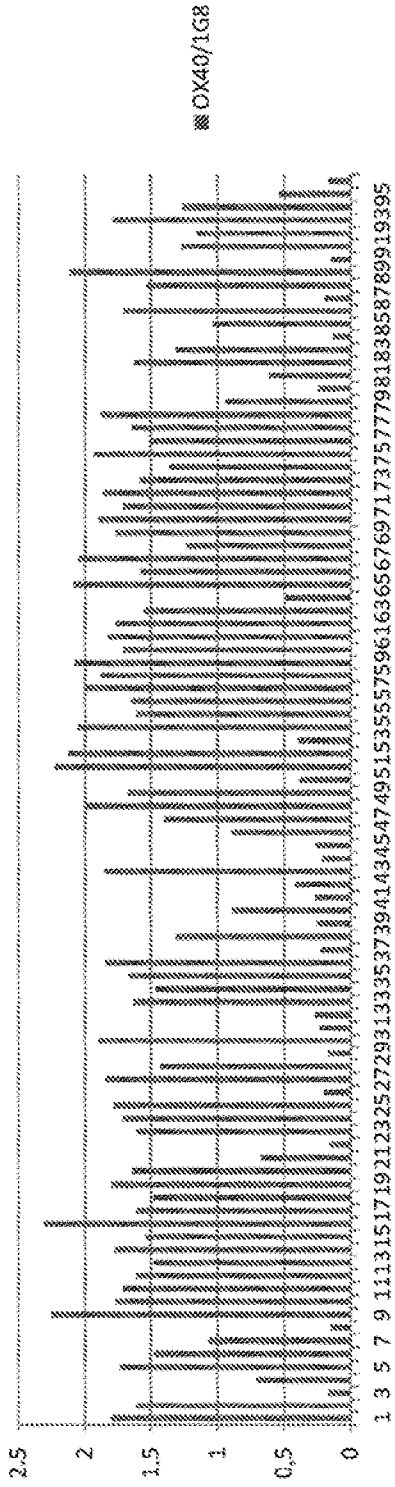


Fig. 3A

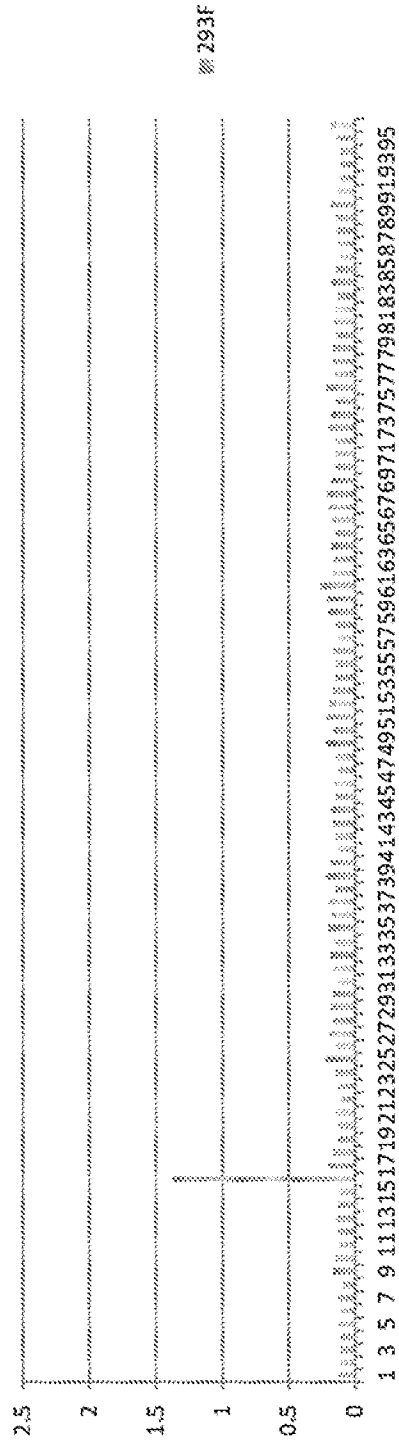


Fig. 3B

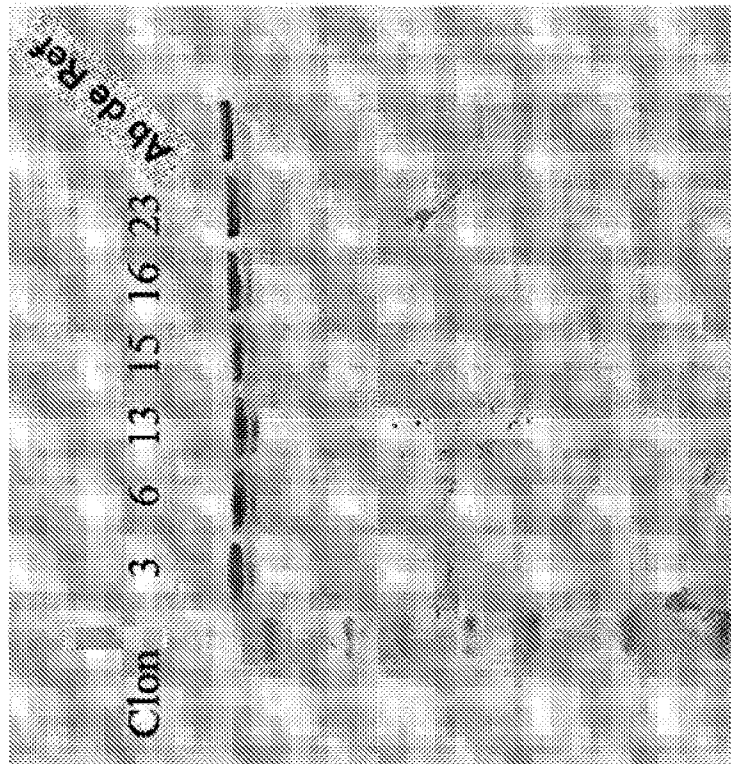


Fig. 4

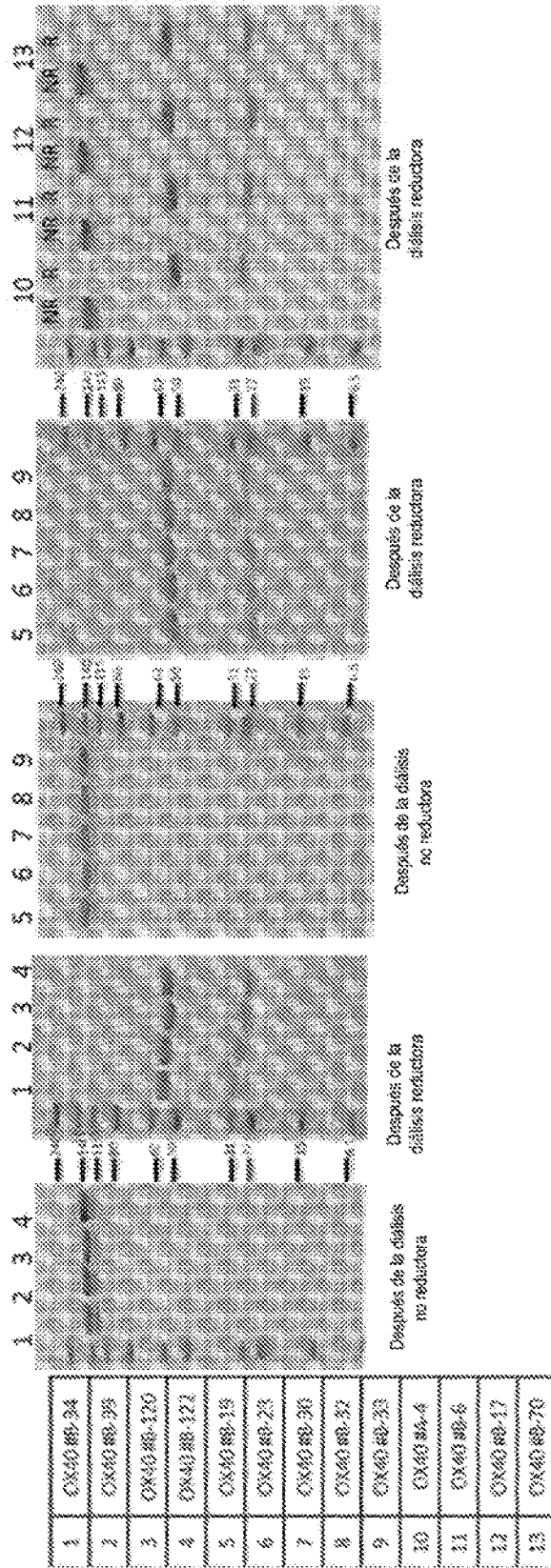


Fig. 5

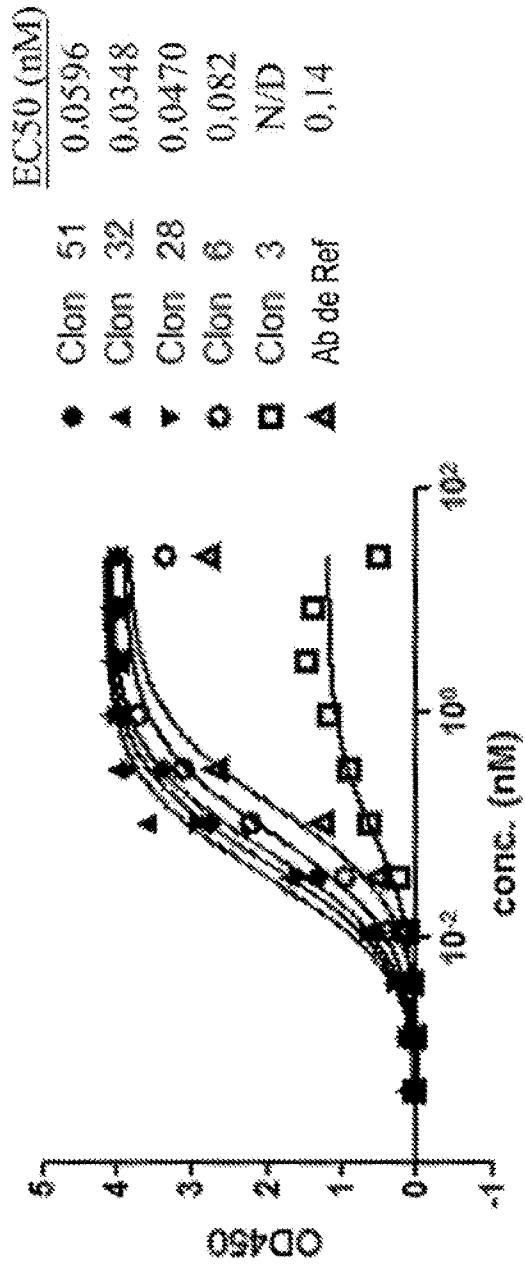


Fig. 6

	EC50 (nM)
● 10 Ab de Ref	0.1282 nM
■ B19 OX40	1.224 nM
▲ B23 OX40	3.719 nM
▼ B30 OX40	2.430 nM

	EC50 (nM)
● 10 Ab de Ref	0.1282 nM
◆ B32 OX40	0.8130 nM
○ B33 OX40	1.250 nM
□ B34 OX40	0.2513 nM
▲ B39 OX40	0.9100 nM

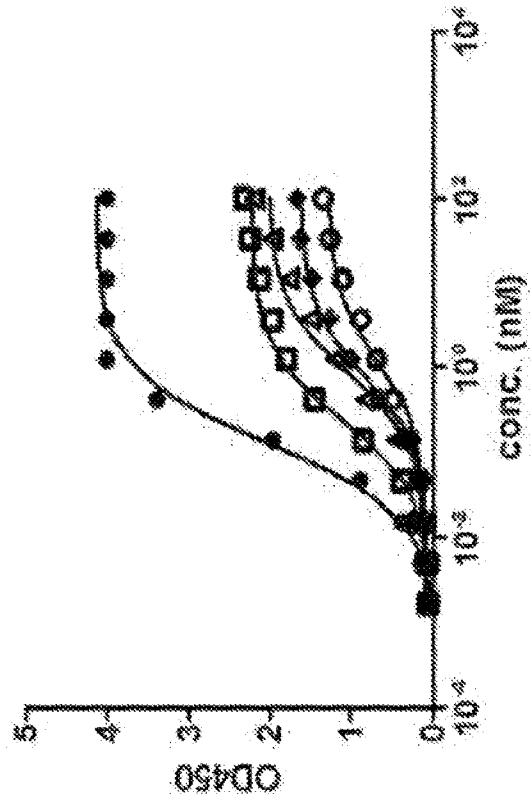
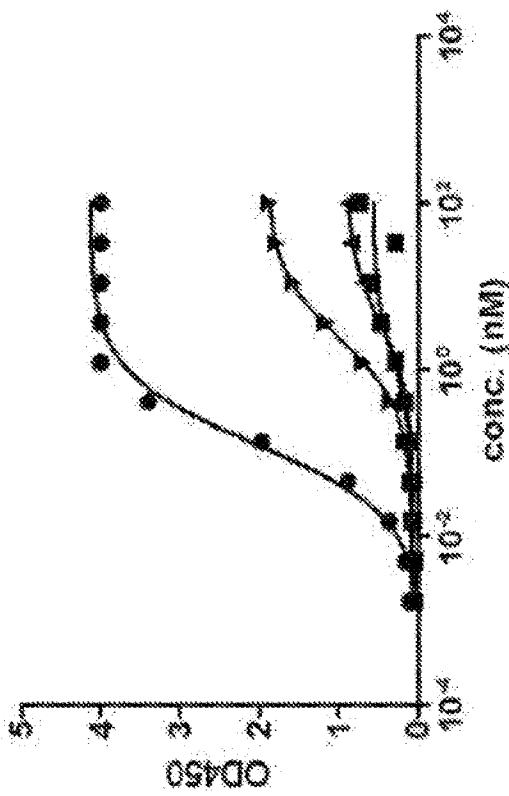


Fig. 7

Lámina de Reemplazo

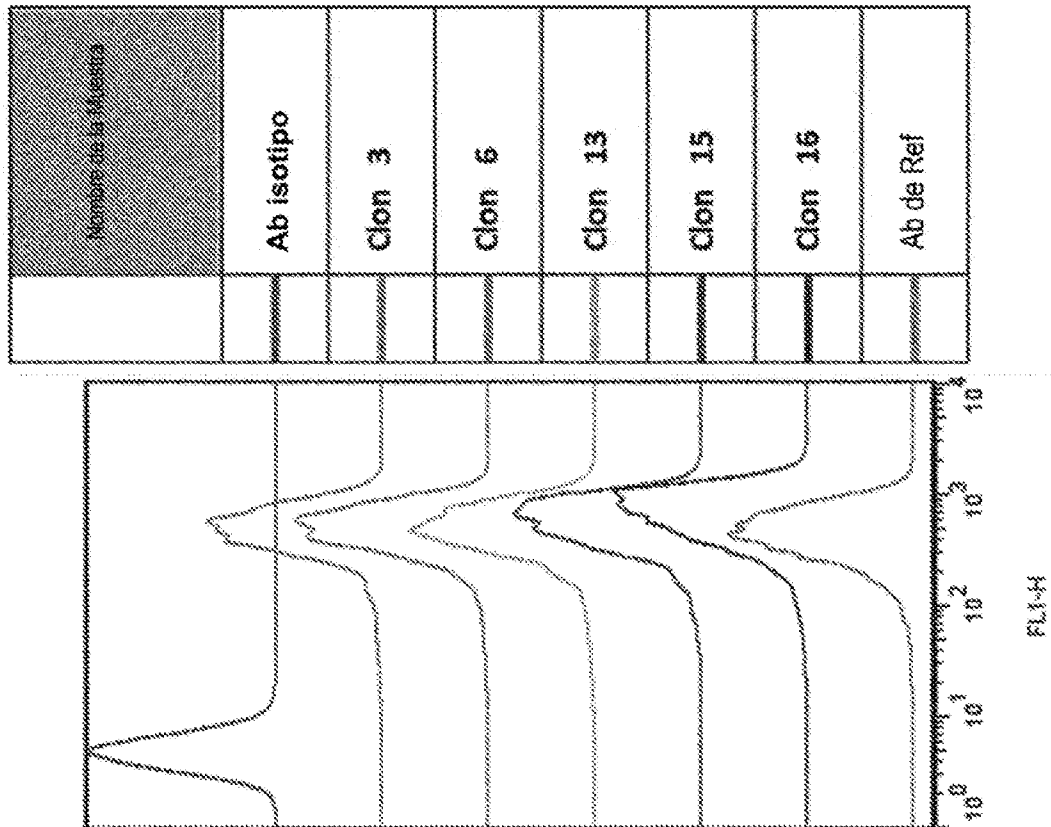
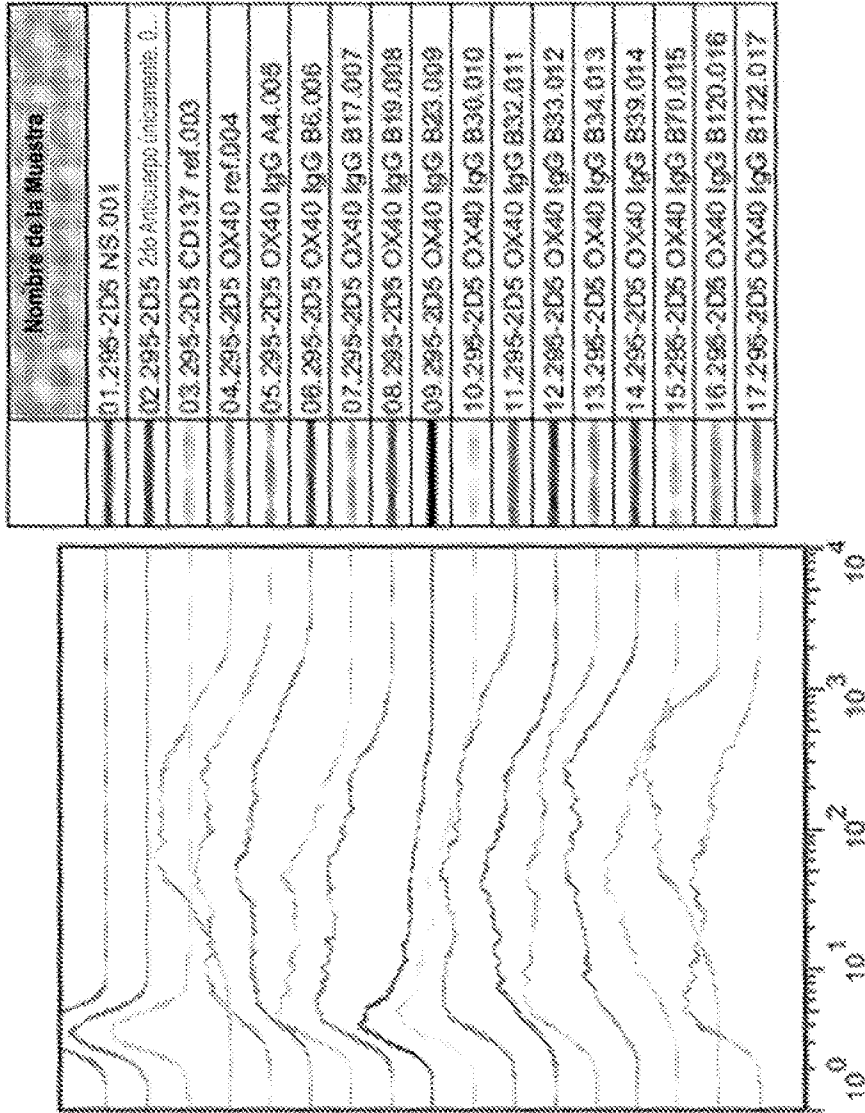


Fig. 8



FLU-H: Anti-HgG-A468

Fig. 9

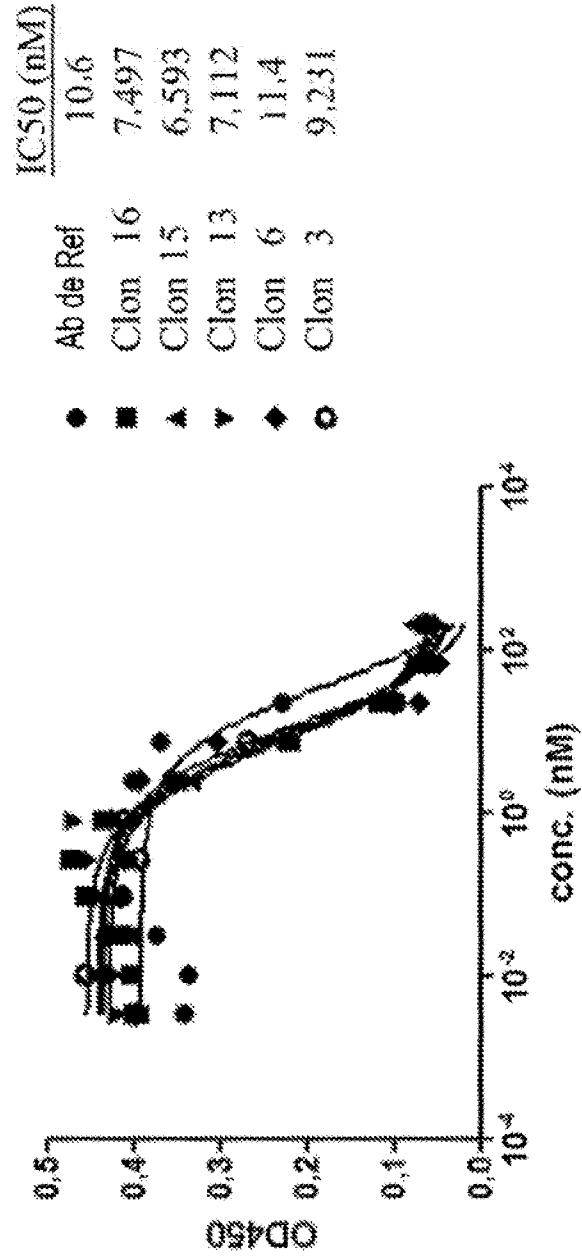


Fig. 10

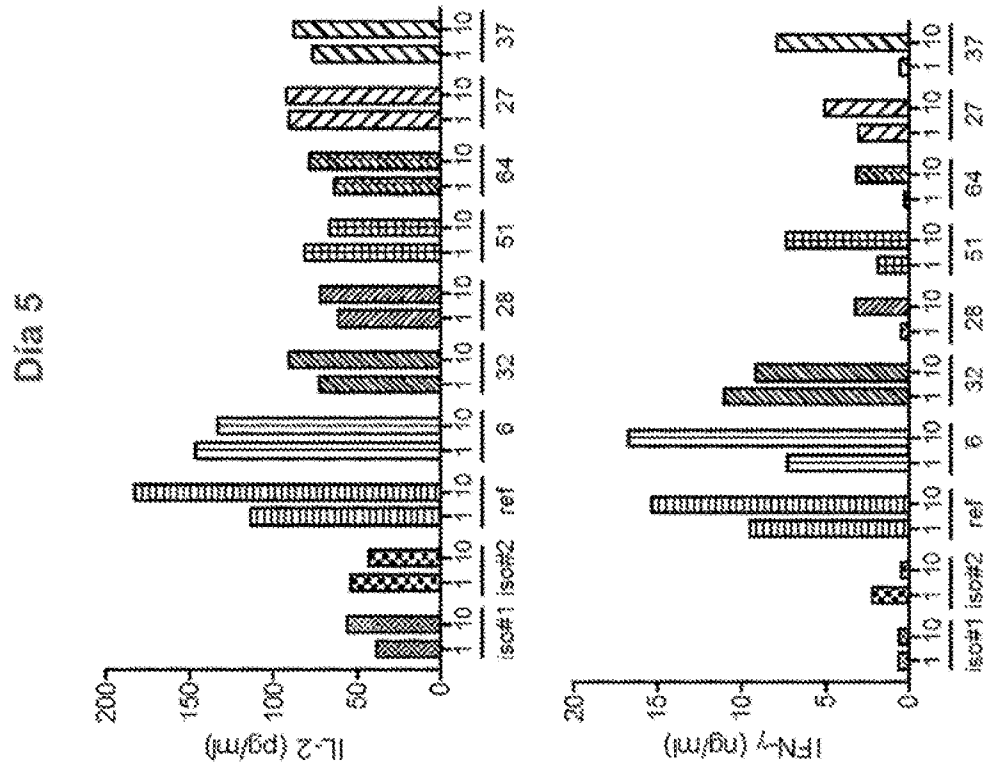


Fig. 11B

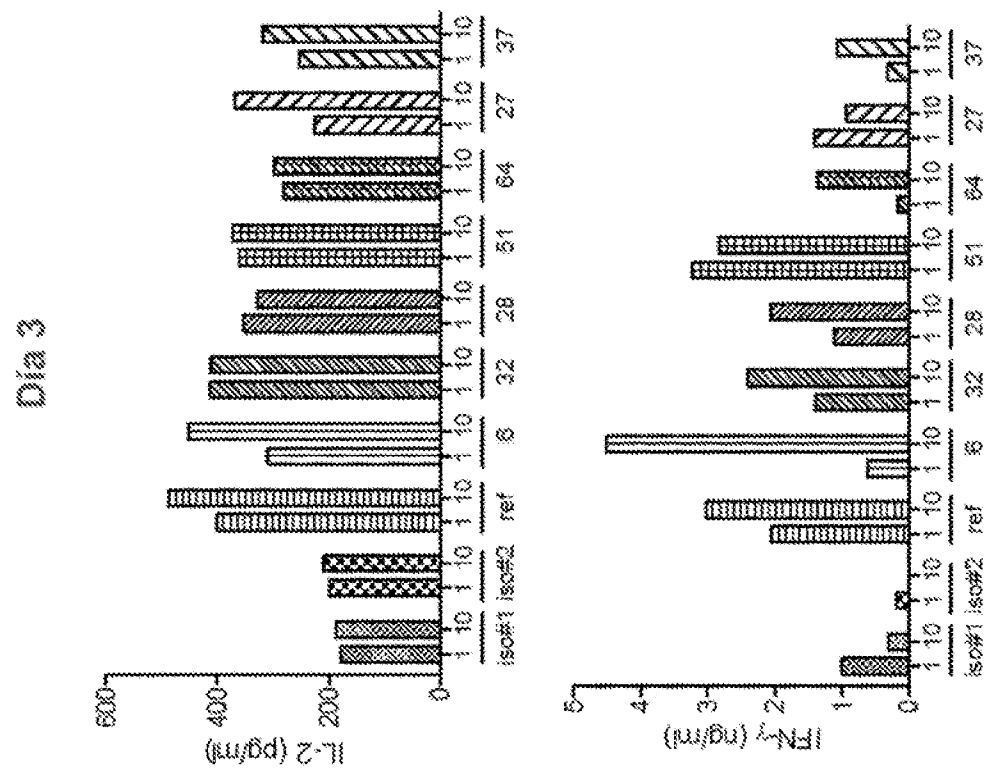


Fig. 11A

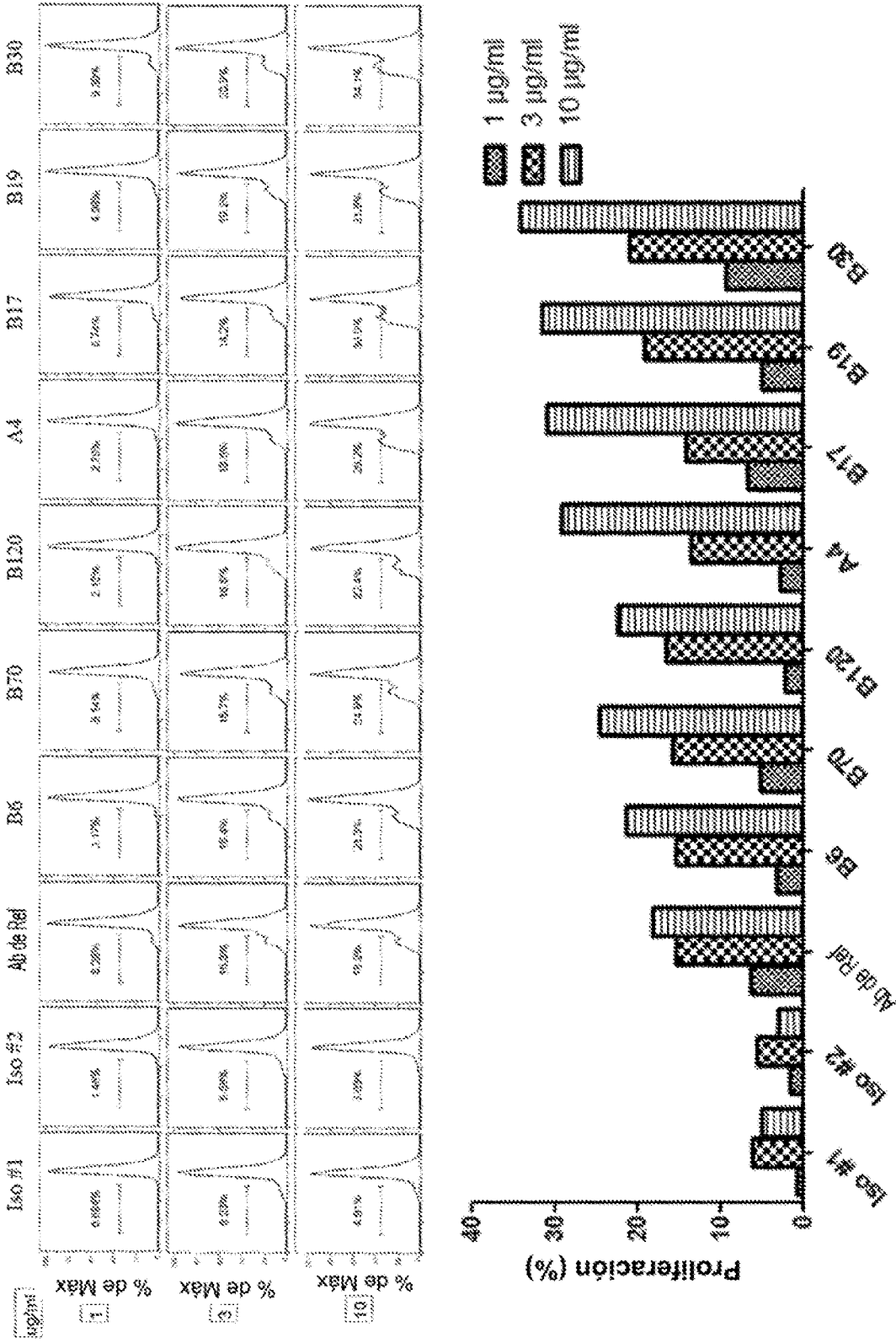


Fig. 12A

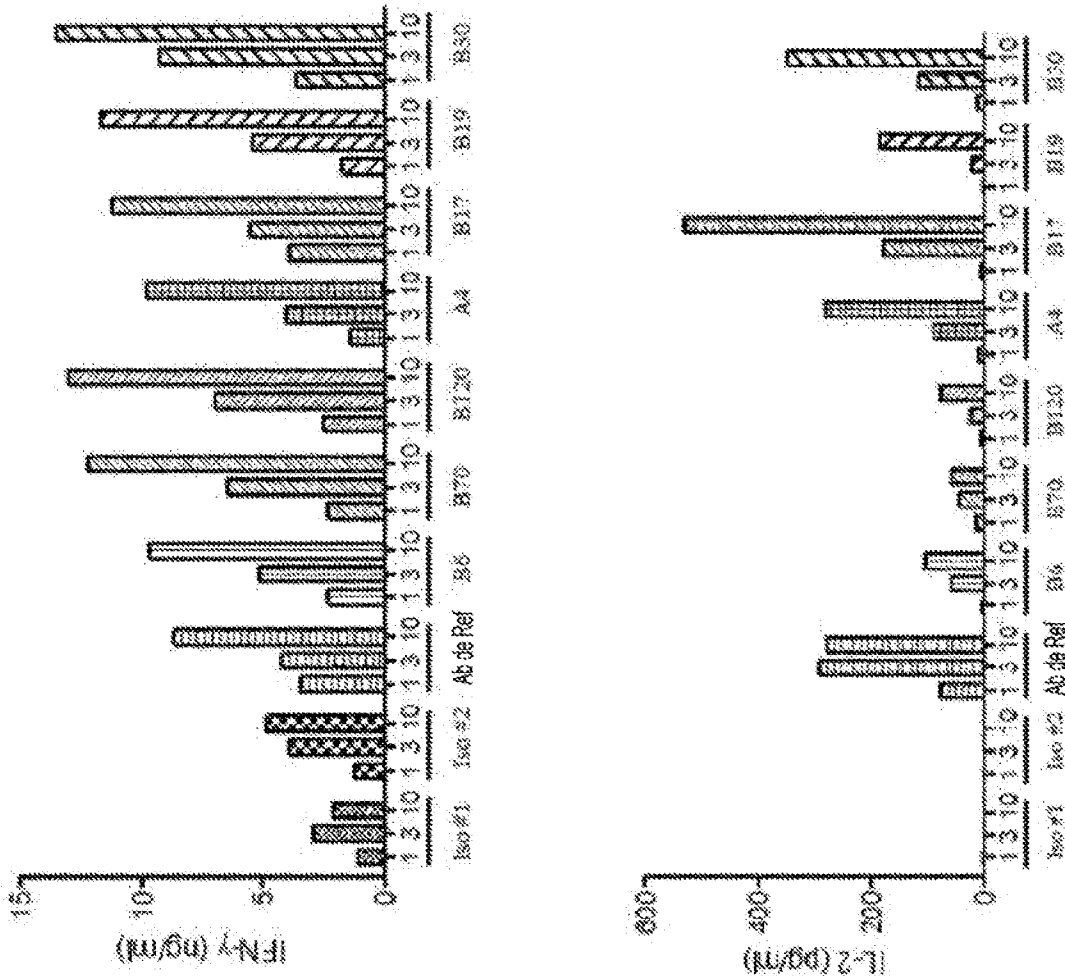


Fig. 12B

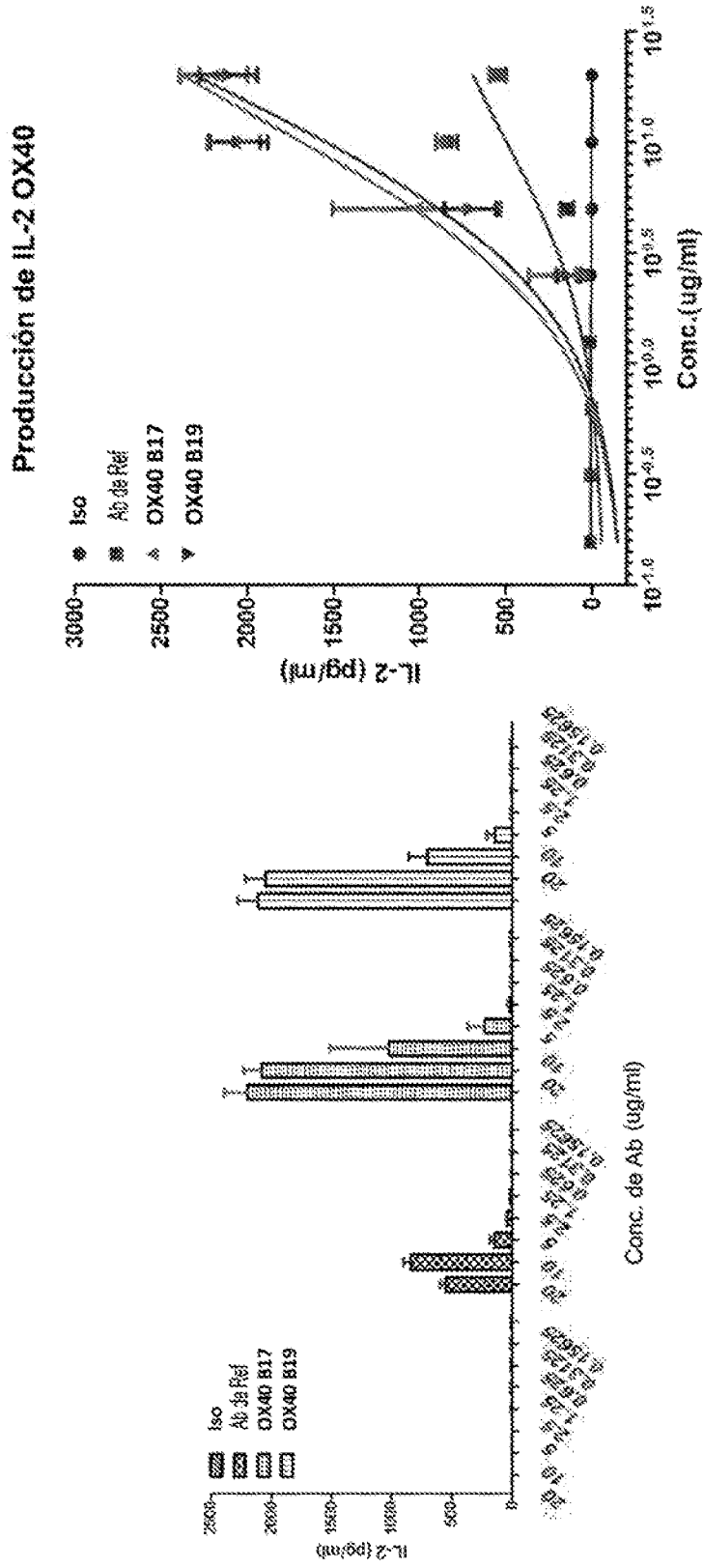


Fig. 13A

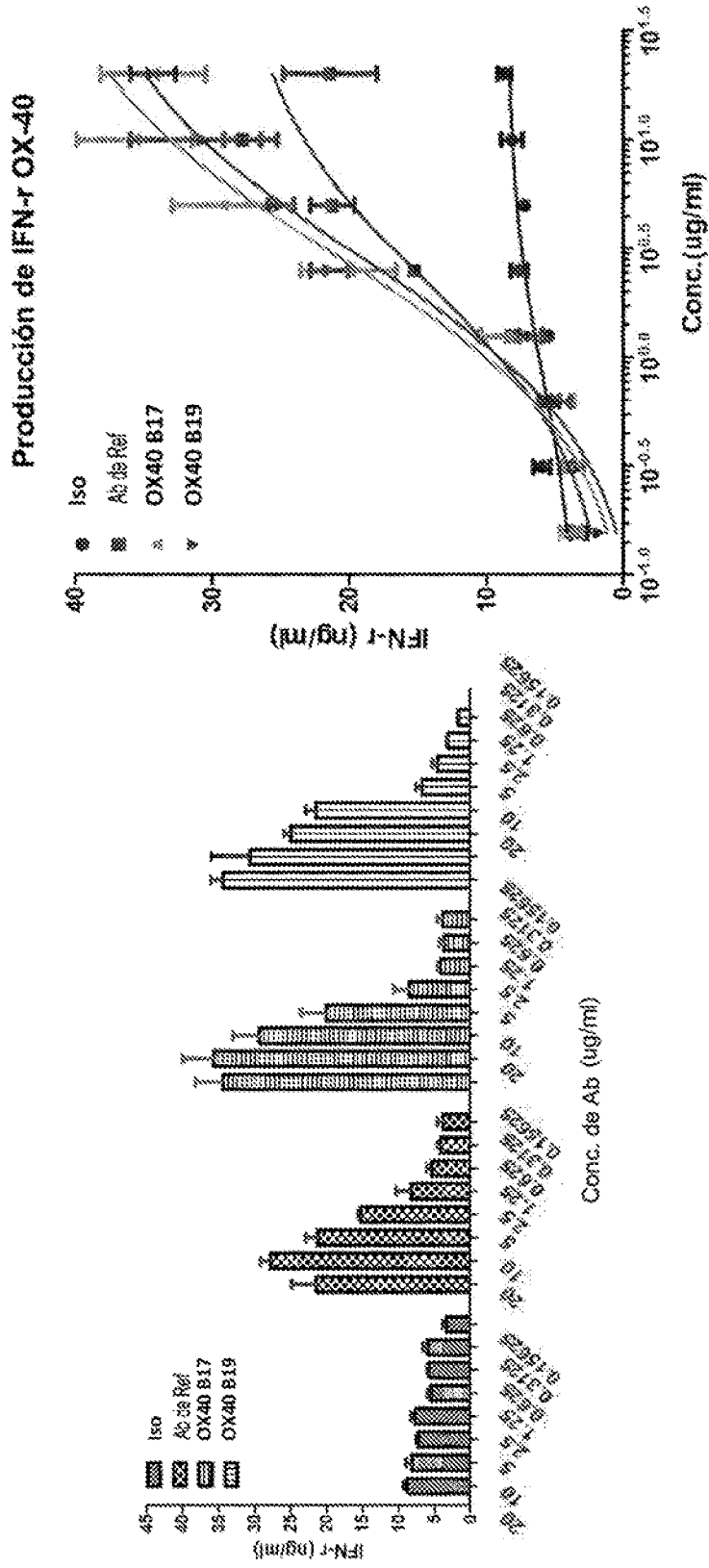


Fig. 13B

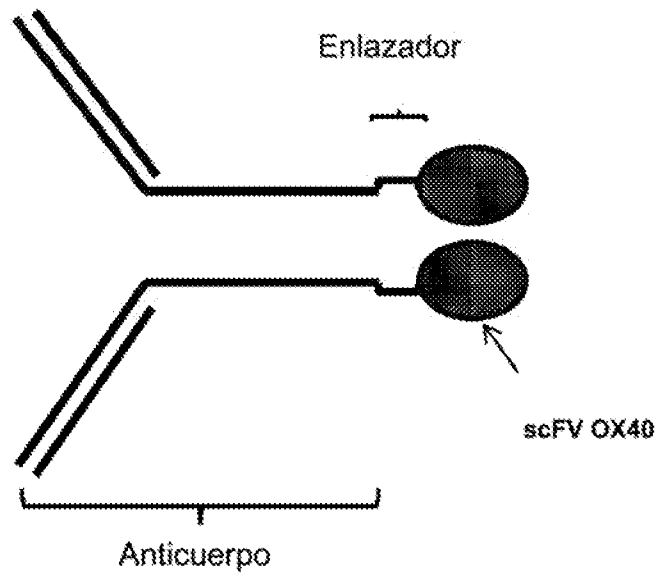


Fig. 14

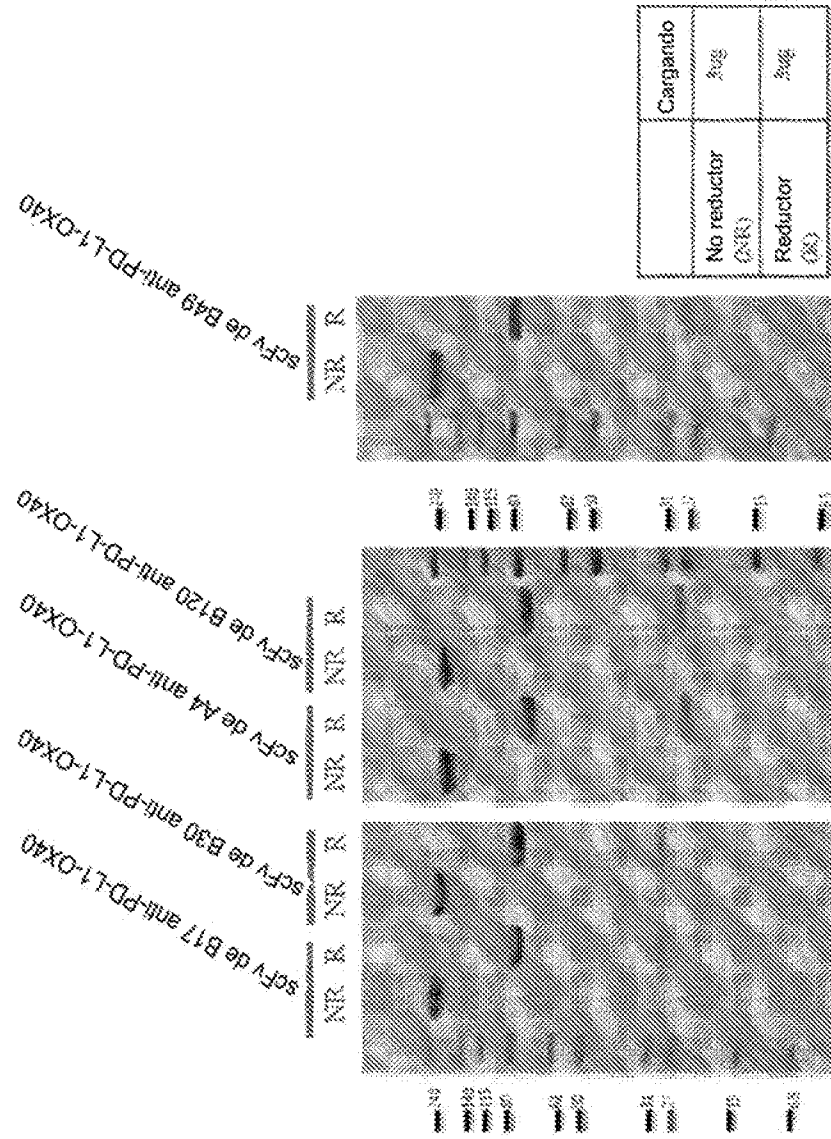


Fig. 15

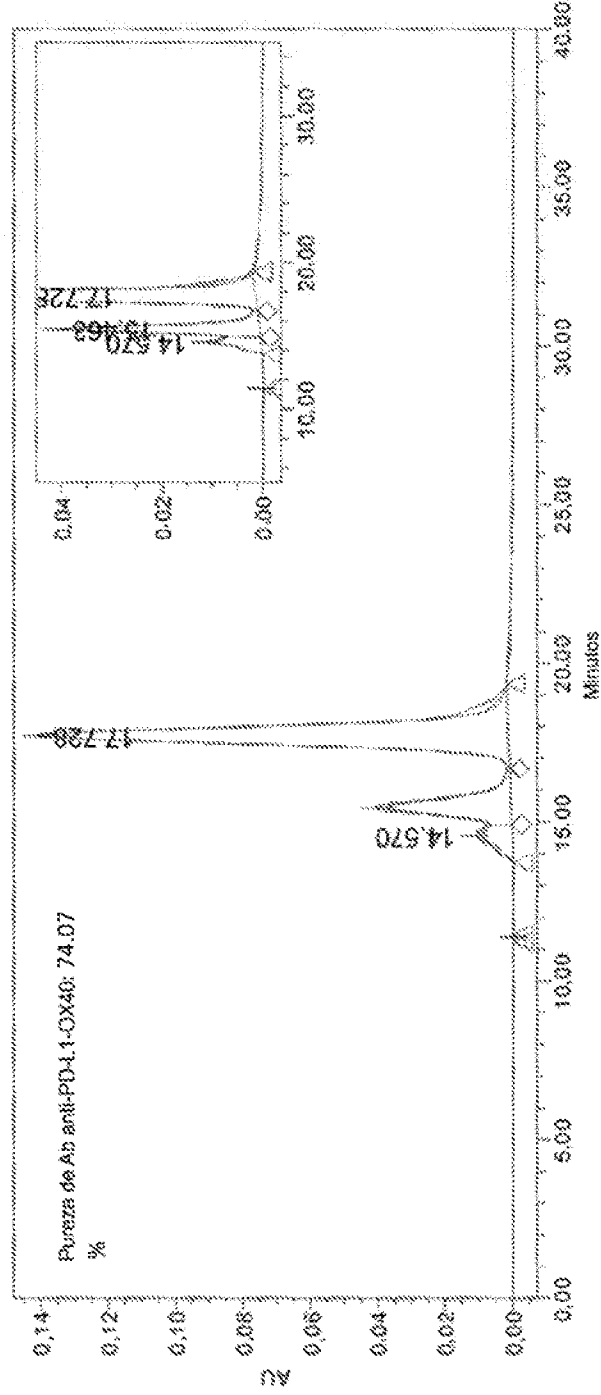


Fig. 17A

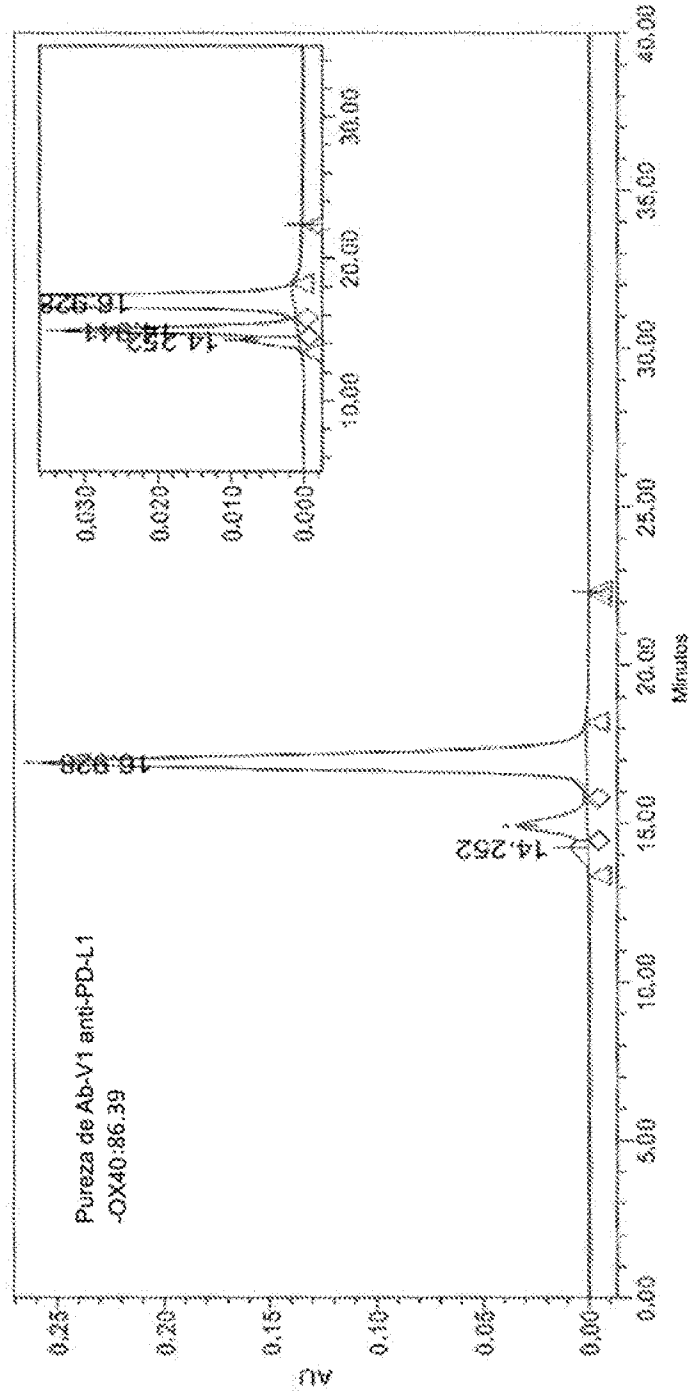


Fig. 17B

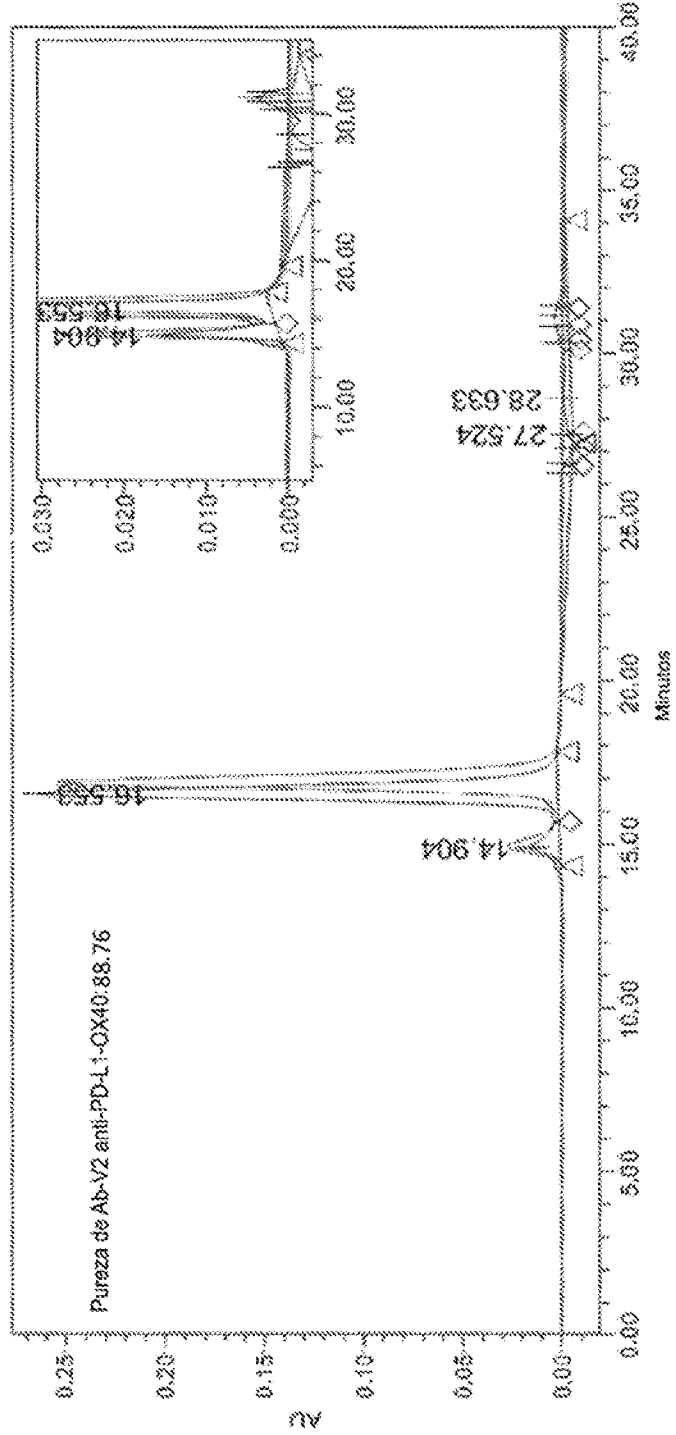
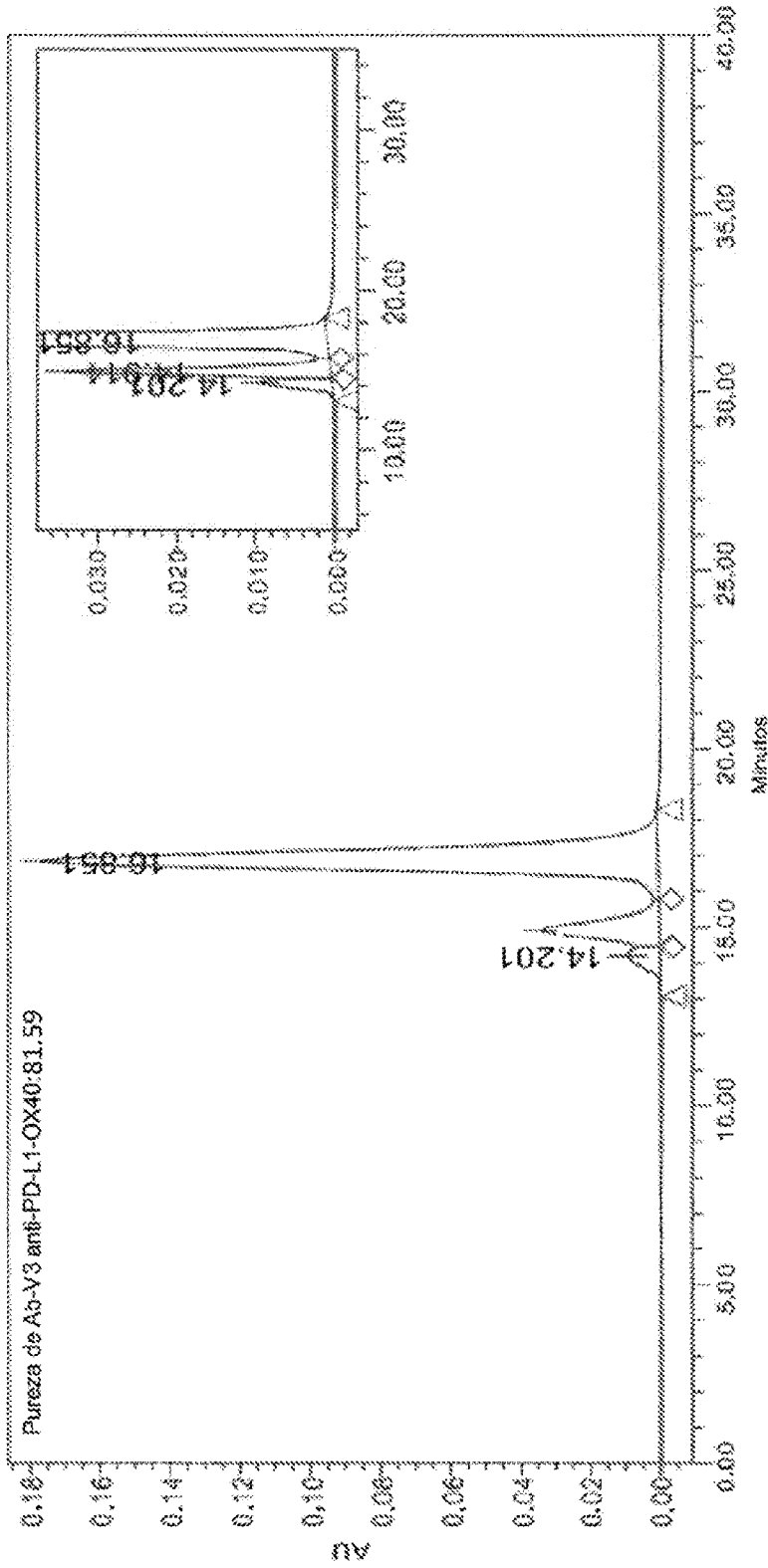


FIG. 17C



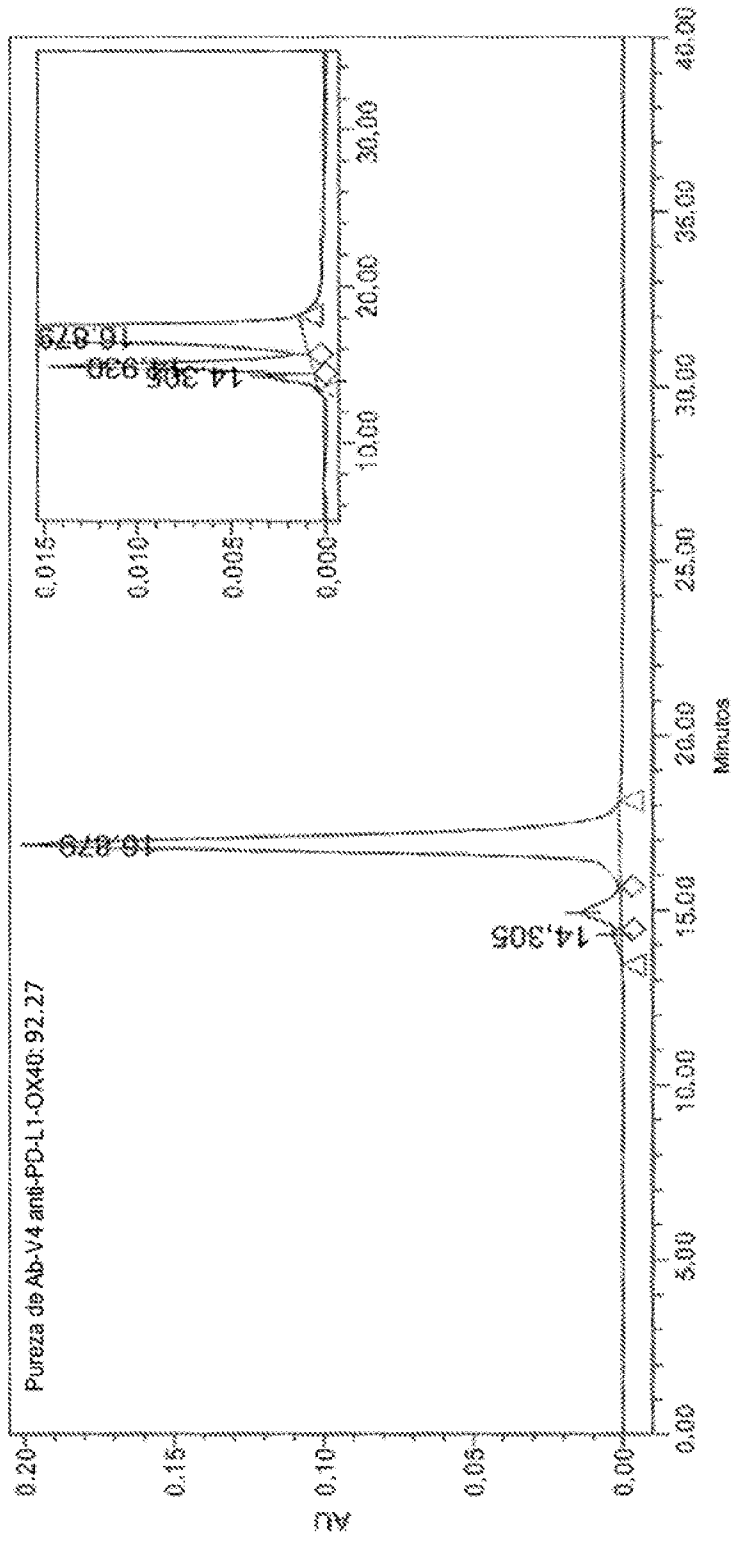


Fig. 17E

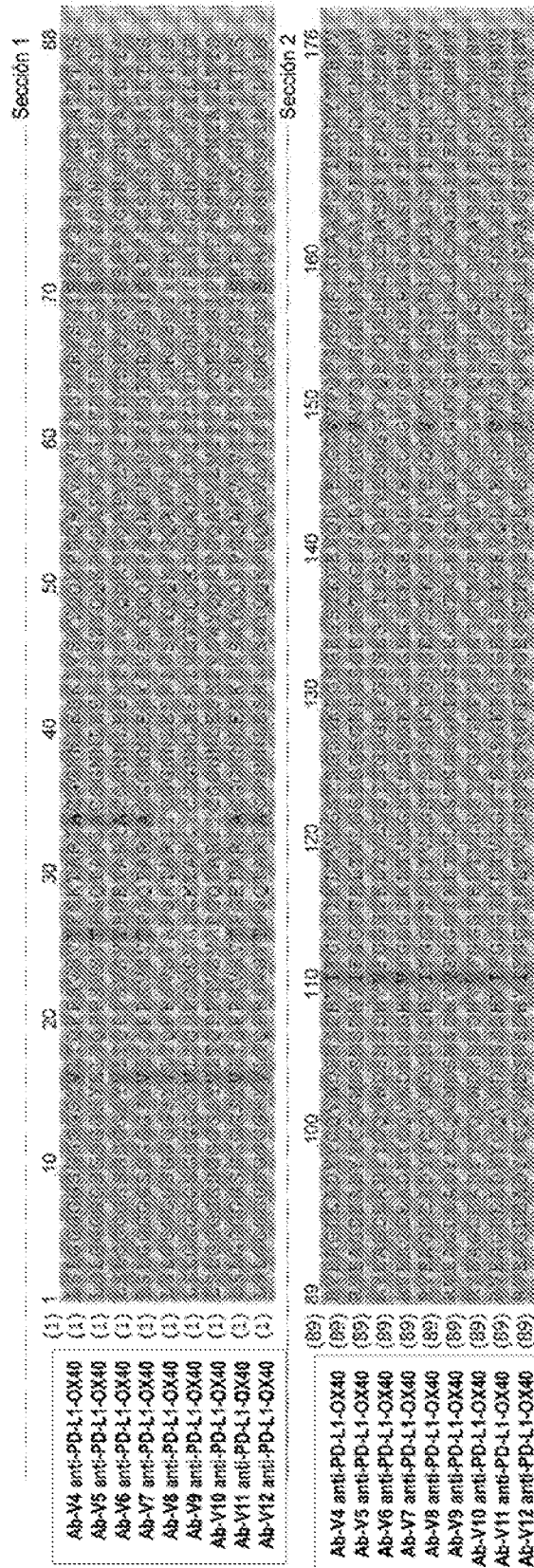


Fig. 18

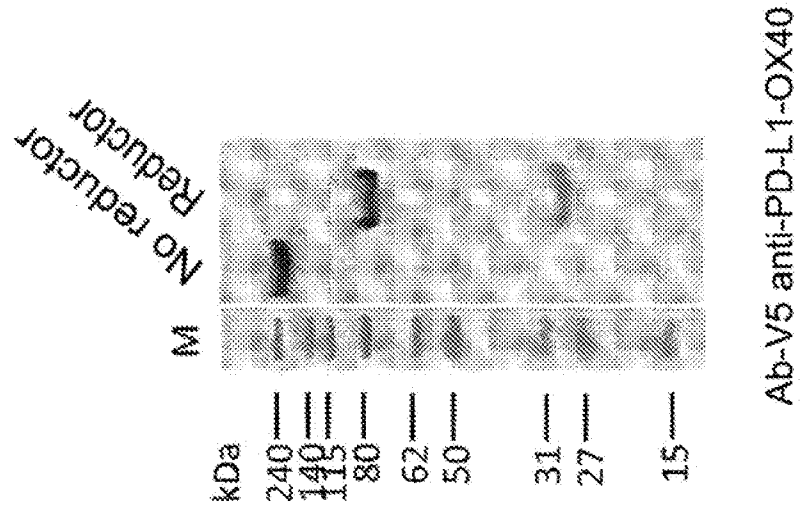


Fig. 19

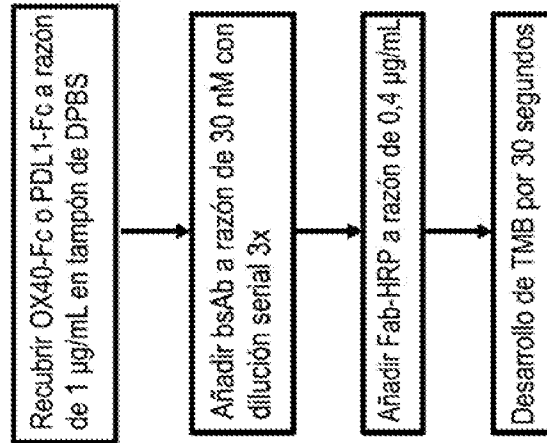


Fig. 20

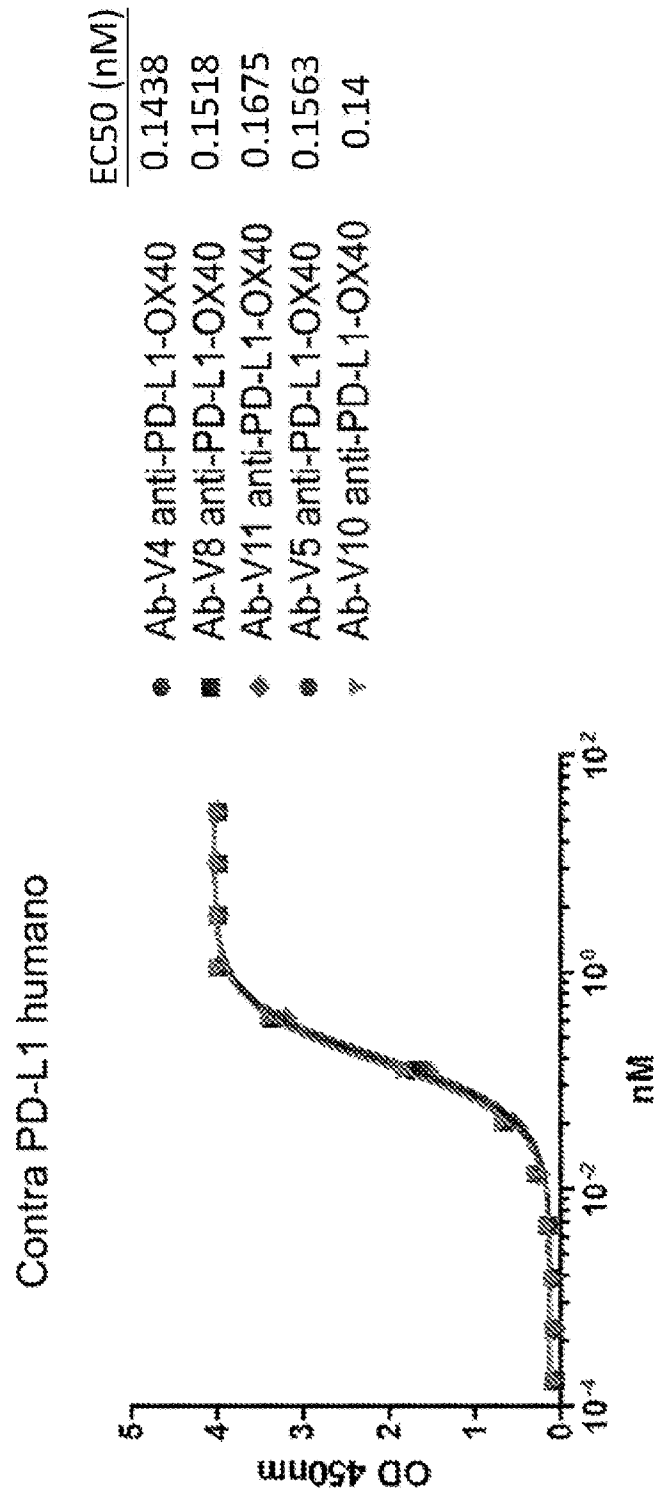


Fig. 21

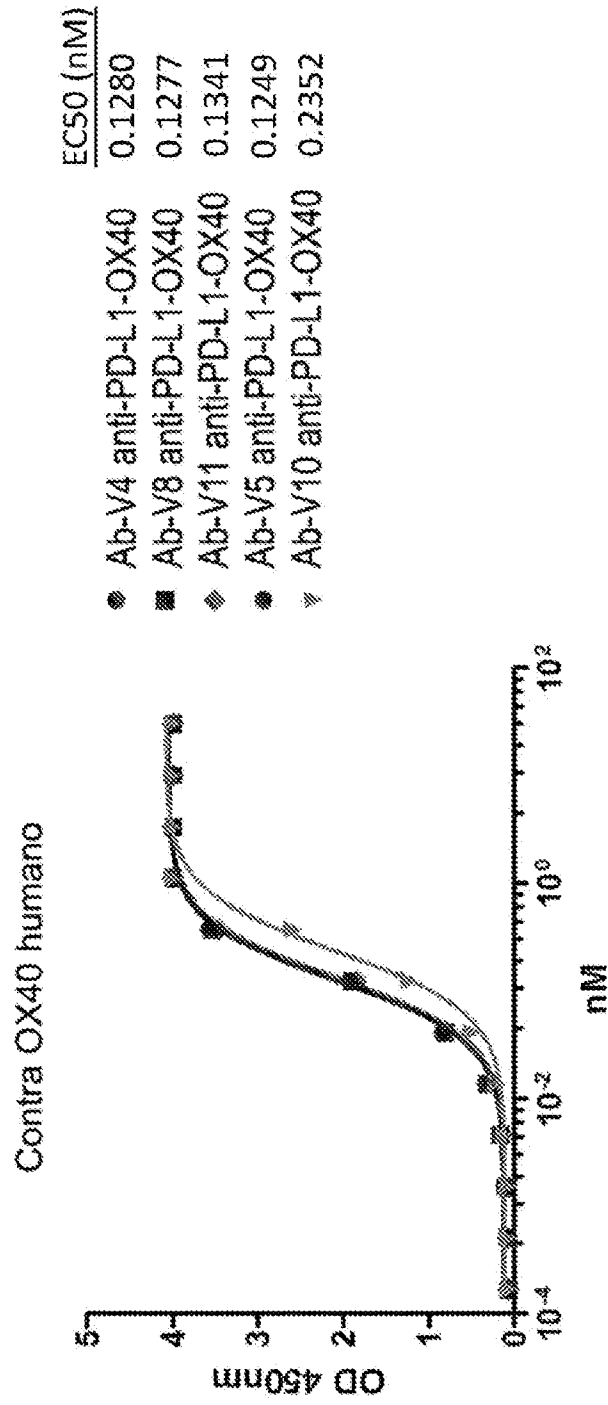


Fig. 22

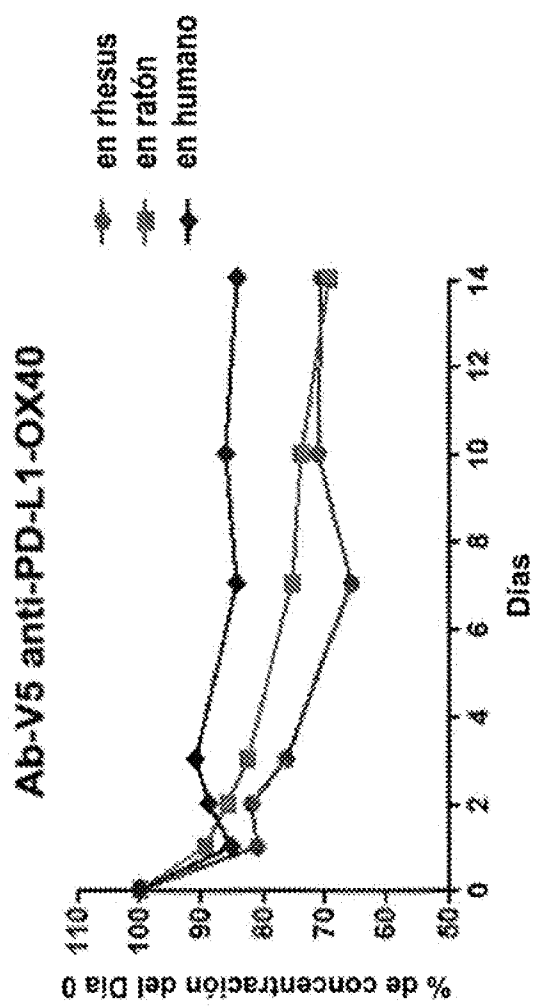


Fig. 23

Dia 3

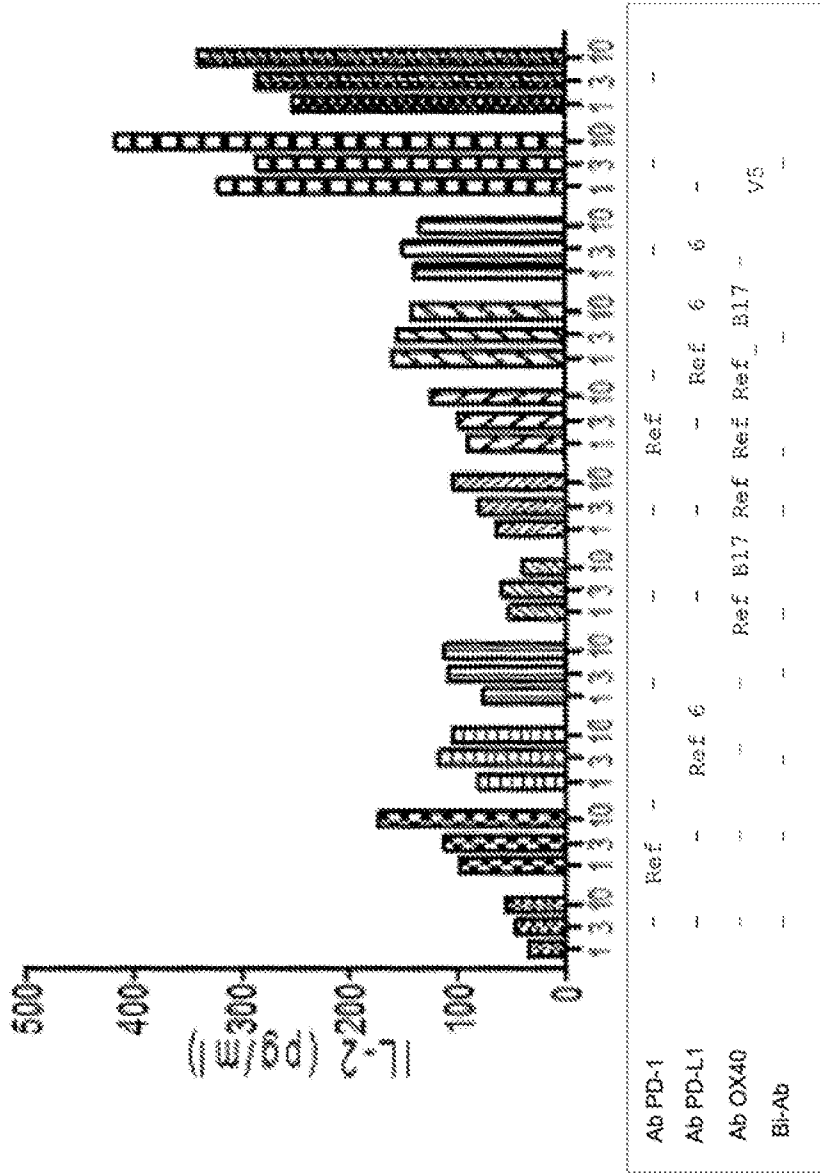


Fig. 24A

Día 5

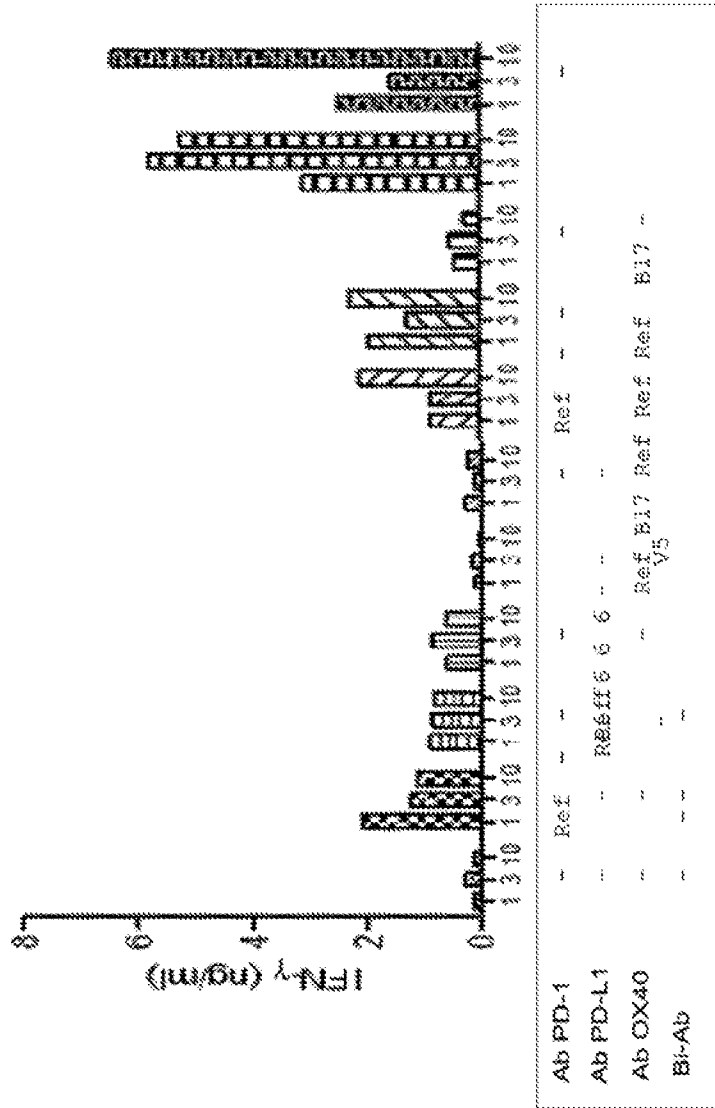


Fig. 24B

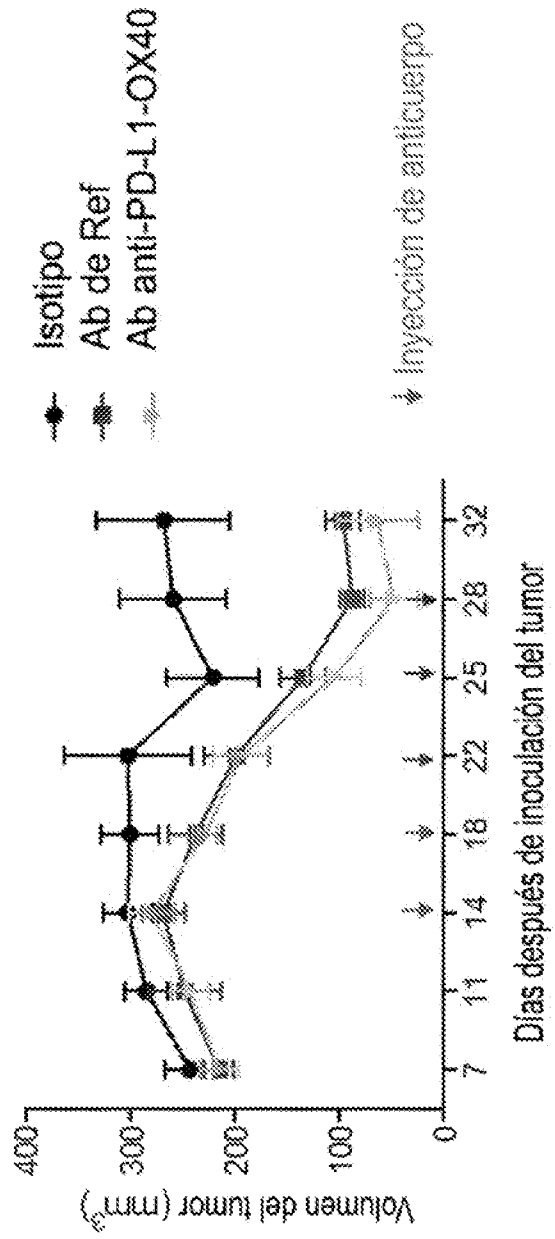


Fig. 25