

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 924 402**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2016 PCT/EP2016/073421**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017 WO17055547**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2016 E 16774691 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2022 EP 3368572**

(54) Título: **Anticuerpos anti-PD-1 y composiciones**

(30) Prioridad:

02.10.2015 US 201562236341 P

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

06.10.2022

(73) Titular/es:

**SYMPHOGEN A/S (100.0%)
Pederstrupvej 93
2750 Ballerup, DK**

(72) Inventor/es:

**GALLER, GUNTHER;
GAD, MONIKA;
KOEFOED, KLAUS;
HORAK, IVAN D.;
BOUQUIN, THOMAS;
KRAGH, MICHAEL y
PEDERSEN, MIKKEL**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 924 402 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

Anticuerpos anti-PD-1 y composiciones

Antecedentes de la invención

PD-1, también conocida como Proteína de Muerte Celular Programada 1 y CD279, es un receptor de superficie celular de 268 aminoácidos que pertenece a la super familia de inmunoglobulinas. PD-1 es un miembro de la familia CD28 de reguladores de células T y se expresa en células T, células B y macrófagos. Se une a los ligandos PD-L1 (también conocido como homólogo de B7) y PD-L2 (también conocido como B7-DC).

PD-1 es una proteína de membrana de tipo I cuya estructura incluye un dominio extracelular de IgV, una región transmembrana y una cola intracelular que contiene dos sitios de fosforilación. Conocida como una proteína de punto de control inmunitaria, PD-1 funciona como un receptor inmunomodulador inducible, que juega un papel, p.ej., en la regulación negativa de las respuestas de las células T a la estimulación con antígenos.

PD-L1 es el ligando predominante para PD-1. La unión de PD-L1 a PD-1 inhibe la actividad de las células T, reduciendo la producción de citoquinas y suprimiendo la proliferación de las células T. Las células cancerosas que expresan PD-L1 pueden explotar este mecanismo para inactivar la actividad antitumoral de las células T a través de la unión de PD-L1 al receptor PD-1.

En vista de sus propiedades reguladoras de la respuesta inmunitaria, PD-1 se ha investigado como una diana potencial para la inmunoterapia, incluyendo el tratamiento del cáncer y las enfermedades autoinmunes. Dos anticuerpos anti-PD-1, pembrolizumab y nivolumab, han sido aprobados en los Estados Unidos y Europa para tratar ciertos cánceres.

En vista del papel crítico de PD-1 como inmunomodulador, existe la necesidad de terapias inmunológicas nuevas y mejoradas que se dirijan a PD-1 para tratar cánceres y ciertos trastornos del sistema inmunitario.

Compendio de la invención

La presente invención se dirige a nuevos anticuerpos recombinantes que se dirigen a PD-1 como se define en las reivindicaciones, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de estos anticuerpos, y al uso de anticuerpos y composiciones farmacéuticas para mejorar la inmunidad en un paciente, y para el tratamiento de cánceres. originado en tejidos tales como piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas. En comparación con los tratamientos disponibles en la actualidad para tales cánceres, incluyendo tratamientos con anticuerpos, se contempla que los anticuerpos de la invención puedan proporcionar una respuesta clínica superior, ya sea solos o combinados con otro agente terapéutico contra el cáncer, tal como un anticuerpo dirigido a otra proteína inmunitaria de punto de control.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo se une al mismo epítopo de PD-1 humana como, 12819.15384.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende H-CDR1-3 que comprende las secuencias H-CDR1-3, respectivamente, del anticuerpo 12819.15384, Wang et al., (Cancer Immunology Research, vol. 2, núm. 9, pág. 846-856) divulan una caracterización in vivo del anticuerpo anti-PD-1 nivolumab y la toxicología in vivo en primates no humanos.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% (p.ej., al menos 92%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos el 99%) al dominio VH del anticuerpo 12819.15384.

40 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 12819.15384.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de VH del anticuerpo 12819.15384 y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 67.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende L-CDR1-3 que comprende las secuencias L-CDR1-3, respectivamente, del anticuerpo 12819.15384.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un dominio variable de cadena ligera (VL) cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% (p.ej., al menos 92%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos el 99%) al dominio VL del anticuerpo 12819.15384.

50 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de VL del anticuerpo 12819.15384.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene una cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de aminoácidos VL de anticuerpo 12819.15384 y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 68.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende cualquiera de las secuencias de cadena pesada descritas anteriormente y cualquiera de las secuencias de cadena ligera anteriores.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR3 y L-CDR3 del anticuerpo 12819.15384.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 del anticuerpo 12819.15384.
- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un V_H y un V_L cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% (p.ej., al menos 92%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%) a V_H y V_L , respectivamente, del anticuerpo 12819.15384.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un V_H y un V_L que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L , respectivamente, del anticuerpo 12819.15384.
- 15 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene una HC y una LC que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos HC y LC, respectivamente, del anticuerpo 12819.15384.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene (1) una HC que comprende la secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo 12819.15384, y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 67; y (2) una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de V_L de ese anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 68.
- 20 En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de:
- a) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 y 29, respectivamente;
 - b) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 y 35, respectivamente;
 - 25 c) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente;
 - d) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46 y 47, respectivamente;
 - e) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 y 53, respectivamente;
 - f) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 y 59, respectivamente; o
 - 30 g) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 y 65, respectivamente.
- 35 En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que tienen las secuencias de aminoácidos de:
- a) SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente;
 - b) SEQ ID NO: 4 y 66, respectivamente;
 - c) SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente;
 - 40 d) SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente;
 - e) SEQ ID NO: 10 y 11, respectivamente;
 - f) SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente;
 - g) SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente; o
 - h) SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente.
- En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-PD-1 que comprende:
- a) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y 68;
 - b) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y 68;

- c) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68;
- d) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68;
- 5 e) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 68;
- f) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68;
- 10 g) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68; o
- h) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención comprende H-CDR1-3 y L-CDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18-20 y SEQ ID NO: 21-23, respectivamente.
- 15 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68.
- La invención también proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un epítopo de PD-1 que comprende el resto de aminoácido K131, P130, A132, V64 y L128 (p.ej., un anticuerpo 12819). En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo que se une a un epítopo de PD-1 que comprende un resto de aminoácido K131 y E136 (p.ej., un anticuerpo 12865).
- 20 En el presente documento se divulga un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un epítopo de PD-1 que comprende los restos de aminoácido V44 y T145 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 13112 tales como los enumerados en las Tablas 1, 4-7, 9 y 11-14).
- En realizaciones concretas, el anticuerpo o porción se unen a un epítopo de PD-1 que comprende los restos de aminoácido V64, L128, P130, K131 y A132 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819).
- 25 En el contexto de la presente invención se divulga un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un epítopo de PD-1 que comprende los restos de aminoácido 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819 o 12865). En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno se unen a un epítopo de PD-1 que comprende los restos de aminoácido 56-64, 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819). En el presente documento se divulga un anticuerpo o porción que se unen a los restos 69-75 (o un fragmento del mismo) de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819 o 12865). En el presente documento se divulga un anticuerpo o porción que se unen a los restos 136-140 (o un fragmento del mismo) de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819 o 12865). En el presente documento se divulga un anticuerpo o porción que se unen a los restos 69-75 (o un fragmento del mismo) y los restos 136-140 (o un fragmento del mismo) de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819 o 12865).
- 30 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno de la invención tienen al menos una de las siguientes propiedades:
- a) se unen a PD-1 humana con una K_D de 750 pM o menos;
- b) se unen a PD-1 de cinomolgo con una K_D de 7 nM o menos;
- c) se unen a PD-1 de ratón con una K_D de 1 nM o menos;
- d) no se unen a PD-1 de rata;
- e) aumentan la secreción de IL-2 en un ensayo de sangre completa SEB;
- 35 f) aumentan la secreción de IFN- γ en un ensayo de reacción mixta linfocitaria unidireccional;
- g) inhiben la interacción de PD-1 con PD-L1 en al menos 60% a una concentración de 10 g/ml en un ensayo competitivo mediante citometría de flujo;
- h) bloquean la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 en al menos un 90% a una concentración de 10 μ g/ml según se determina mediante análisis de interferometría de Bio-Capa; e
- 40 i) inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*.

- Un ejemplo de tal anticuerpo es, sin limitación, el anticuerpo 12819 (que tiene las propiedades a-i). Los anticuerpos divulgados en el presente documento que tienen algunas de las propiedades son los anticuerpos 12748, 12892 y 12777 (que tienen al menos las propiedades a, b, y e-h); los anticuerpos 12865 y 12796 (que tienen al menos las propiedades a, b, e, f y h) y los anticuerpos 12760 y 13112 (que tienen al menos las propiedades a, b, e, y f). En 5 algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención tienen todas las propiedades mencionadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno tienen al menos las propiedades a, b y e-h. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno tienen al menos las propiedades a, b, e, f, y h. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno tienen al menos las propiedades a, b, e, y f.
- 10 A menos que se indique lo contrario, 12819, 12748, 12865, 12892, 12796, 12777, 12760 y 13112 se refieren a un grupo de anticuerpos que tienen las mismas seis CDR y que comparten los primeros cinco dígitos en sus designaciones numéricas de diez dígitos. Por ejemplo, 12748 incluye las variantes de anticuerpo 12748.15381 y 12748.16124, que tienen las mismas seis CDR (como se muestra en la Tabla 2). Se espera que cada grupo de anticuerpos comparta las mismas o sustancialmente las mismas propiedades biológicas.
- 15 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención no compiten por la unión a PD-1 con pembrolizumab o nivolumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención no se unen al mismo epítopo que pembrolizumab o nivolumab; por ejemplo, el anticuerpo o la porción de la invención se unen a uno o más restos en PD-1 que no se unen a pembrolizumab o nivolumab.
- 20 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 La presente invención proporciona adicionalmente moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo anti-PD-1 como se describe en la presente memoria.
- La presente invención también proporciona vectores que comprenden una molécula de ácido nucleico aislada de este tipo, en donde dicho vector comprende adicionalmente una secuencia de control de la expresión.
- 30 La presente invención también proporciona células anfítrionas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo PD-1 como se describe en la presente memoria.
- 35 La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria, que comprende proporcionar una célula anfítriona que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-PD-1 como se describe en la presente memoria, cultivando dicha célula anfítriona en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o porción, y aislando el anticuerpo o porción resultante.
- 40 La presente invención también proporciona una molécula de unión biespecífica que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente memoria y la especificidad de unión de otro anticuerpo anti-PD-1 (p.ej., otro anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente memoria) o un anticuerpo que se dirige a una proteína diferente, tal como otra proteína inmunitaria de punto de control, un antígeno canceroso u otra molécula de superficie celular cuya actividad media en una enfermedad tal como el cáncer.
- 45 La presente invención también proporciona un método para mejorar la inmunidad en un paciente (p.ej., un paciente humano) que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo, una composición farmacéutica, o una molécula de unión biespecífica como se describe en la presente memoria.
- 50 La presente invención proporciona adicionalmente un método para tratar el cáncer en un paciente (p.ej., un paciente humano), que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo, una composición farmacéutica, o una molécula de unión biespecífica como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el cáncer se origina en un tejido seleccionado del grupo que consiste en piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas. El cáncer puede ser, por ejemplo, melanoma avanzado o metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales o linfoma de Hodgkin. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente administrar un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un agente anti-angiogénico, un inhibidor de tirosina quinasa, o un inhibidor de la ruta de PD-1.
- 55 La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos o porciones de unión a antígeno de la presente

invención para su uso en los tratamientos mencionados anteriormente, y el uso de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de la presente invención para la fabricación de medicamentos para los tratamientos mencionados anteriormente, es decir, el tratamiento de un ser humano que lo necesite para mejorar su sistema inmunitario, y el tratamiento de un ser humano con cáncer, tal como uno de los cánceres mencionados anteriormente.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra un producto de PCR que contiene las regiones V_H y V_L del anticuerpo anti-PD-1 AAS-12819 (que se muestra en color negro) clonadas en marco con la correspondiente cadena pesada humana IgG1-CH1-CH2-CH3 y fragmentos constantes lambda de la cadena ligera humana, respectivamente. Los sitios de restricción para esta clonación son Apal y AvrII. Los sitios de restricción Ascl y Nhel se muestran entre los extremos 5' de V_H y V_L . El origen de replicación del plásmido se representa como pUCo y el gen que confiere resistencia a ampicilina se representa como AmpR.

10 La Figura 2 muestra una construcción de expresión con un promotor doble CMV insertado entre los extremos 5' de V_H y V_L utilizando sitios de restricción Ascl y Nhel. Las secuencias V_H y V_L se representan en color negro, otros elementos genéticos anotados se representan en color blanco.

15 Las Figuras 3A-3C muestran gráficos de puntos de citometría de flujo representativos para (A) un clon de anticuerpo que se une específicamente a células transfectadas con PD-1 humana, (B) un clon que no se une específicamente a células CHO-S, y (C) un clon que no se une a ninguna de las poblaciones celulares utilizadas en el escrutinio.

La Figura 4 muestra la frecuencia de linfocitos que expresan PD-1 en seis donantes (D1-D6) antes y después de la estimulación con SEB (Enterotoxina B de *Staphylococcus*).

20 Las Figuras 5 A-1 muestran la titulación de anticuerpos anti-PD-1 candidatos en un ensayo con SEB.

Las Figuras 6A-H muestran la titulación de anticuerpos anti-PD-1 candidatos en un ensayo MLR unidireccional.

Las Figuras 7A-B muestran la unión de PD-L1 a células que expresan PD-1 en presencia de anticuerpos anti-PD-1.

25 La Figura 8 muestra una descripción general de los grupos de epítopos identificados (depósitos de epítopos) para anticuerpos anti-PD-1 sometidos a ensayo 12866.13188, 12807.13177, 12819.17149, 12865.17150, 12892.13195, 12777.15382, 12760.13169, 13112.15380, y nivolumab y análogos de pembrolizumab. Los anticuerpos conectados por líneas de color negras indican actividad de bloqueo cruzado. Los anticuerpos se agrupan de acuerdo con los patrones de competencia con otros anticuerpos anti-PD-1. Nivo: análogo de nivolumab; Pembro: análogo de pembrolizumab.

30 La Figura 9 (paneles A-G) muestra la ubicación de epítopos de anticuerpos en la estructura de PD-1 humana (PDB 4ZQK y 2M2D). A) Viñeta del dominio extracelular (ECD) de PD-1 humana (restos 33-150). Se ilustran la ubicación del GFCC y la hoja β de ABED y el bucle C'-D. B) Viñeta de PD-1 humana: complejo PD-L1 humano en los mismos ángulos de visión que en (A). C) Modelo molecular del epítopo de pembrolizumab que se muestra como un mapa de densidad con áreas más oscuras que representan regiones que median una unión más fuerte. Las zonas de color negro representan restos de contacto encontrados mediante barrido de alanina. D) Modelo molecular del epítopo nivolumab representado como en (C). E) Modelo molecular del epítopo de anticuerpo 12819 representado como en (C). F) Modelo molecular del epítopo de anticuerpo 12865 representado como en (C).

35 La Figura 10 (paneles A-D) muestra el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-PD-1 12819, 17149 o un vehículo sobre el crecimiento tumoral en cuatro modelos de tumor singénico. A) CT26 (cáncer de colon). B) C38 (cáncer de colon). C) ASB-XIV (cáncer de pulmón). D) Sa1N (fibrosarcoma). El área de color gris indica el período de tratamiento.

40 Los datos se presentan como medias \pm ETM. * P <0,001.

45 La Figura 11 muestra el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-PD-1 12819.17149, pembrolizumab (Keytruda®), o vehículo sobre el crecimiento tumoral de un modelo de tumor de xenoinjerto semi-humanizado, donde la línea celular de melanoma humano A375 se mezcló con células T humanas CD8+ y CD4+ purificadas antes de la inoculación. El área de color gris indica el período de tratamiento. Los datos se presentan como medias \pm ETM. * P <0,001.

45 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos anti-PD-1 humana como se define en las reivindicaciones que pueden usarse para mejorar el sistema inmunitario en un paciente humano, tal como un paciente con cáncer. A menos que se indique lo contrario, como se emplea en la presente memoria, "PD-1" se refiere a PD-1 humana. Una secuencia de polipéptido de PD-1 humana está disponible bajo el Número de Acceso Uniprot Q15116 (PDCD1_HUMAN), que se muestra aquí como SEQ ID NO: 1.

50 El término "anticuerpo" (Ab) o "inmunoglobulina" (Ig), como se emplea en la presente memoria, se refiere a un tetramero que comprende dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por un dominio variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está

compuesta por un dominio variable de cadena ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (CL). Los dominios V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). Cada V_H y V_L está compuesto de tres CDR (H-CDR designa aquí una CDR de la cadena pesada, y L-CDR designa una CDR de la cadena ligera) y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La asignación de los números de aminoácidos en la cadena pesada o ligera puede ser de acuerdo con las definiciones del IMGT® (Lefranc et al, Dev Comp Immunol 27(1):55-77 (2003)); o las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 y 1991)); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); o Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se expresa a partir de una célula o línea celular que comprenden la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo, donde dicha o dichas secuencias de nucleótidos no están asociadas de forma natural con la célula.

Los términos "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" se refieren a una proteína, polipéptido o anticuerpo que, en virtud de su origen o fuente de obtención (1), no están asociados con los componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo, (2) están libres de otras proteínas de la misma especie, (3) son expresados por una célula de una especie diferente y/o (4) no aparecen en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina de manera natural se "aislará" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "línea germinal" se refiere a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de genes de anticuerpos y segmentos de genes a medida que pasan de padres a hijos a través de células germinales. Las secuencias de la línea germinal se distinguen de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos en células B maduras, que han sido alteradas por eventos de recombinación e hipermutación durante el curso de la maduración de células B. Un anticuerpo que "utiliza" una secuencia de línea germinal concreta tiene una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que se alinea con esa secuencia de nucleótidos de la línea germinal o con la secuencia de aminoácidos que especifica más estrechamente que con cualquier otra secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la línea germinal.

El término "afinidad" se refiere a una medida de la atracción entre un antígeno y un anticuerpo. La capacidad de atracción intrínseca del anticuerpo por el antígeno se expresa típicamente como la constante de equilibrio de afinidad de unión (K_D) de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la K_D es <1 mM, preferiblemente <100 nM. Una constante de afinidad de unión K_D se puede medir, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore™) o Interferometría de Bio-Capa, utilizando por ejemplo el sistema ProteOn™ XPR36 SPR de Bio-Rad o el sistema Octet™.

El término " K_{off} " se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Una constante de velocidad de disociación K_{off} se puede medir mediante Interferometría Bio-Capa, por ejemplo, utilizando el sistema Octet™.

El término "epítopo", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una porción (determinante) de un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo o a una molécula relacionada tal como una molécula de unión biespecífica. Los determinantes epítópicos generalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de azúcar y, en general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítopo puede ser "lineal" o "conformacional". En un epítopo lineal, todos los puntos de interacción entre una proteína (p.ej., un antígeno) y una molécula que interactúa (tal como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítopo conformacional, los puntos de interacción ocurren a través de restos de aminoácido en la proteína que están separados entre sí en la secuencia de aminoácidos primaria. Una vez que se determina un epítopo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos para ese epítopo utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede generar un anticuerpo para un epítopo lineal, por ejemplo, inmunizando un animal con un péptido que tiene los restos de aminoácido del epítopo lineal. Se puede generar un anticuerpo para un epítopo conformacional, por ejemplo, inmunizando un animal con un mini dominio que contiene los restos de aminoácido relevantes del epítopo conformacional. También se puede generar un anticuerpo para un epítopo particular, por ejemplo, inmunizando un animal con la molécula objetivo de interés o una porción relevante de la misma (p.ej., el ECD de PD-1), luego seleccionando la unión al epítopo.

Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítopo o compite por la unión con un anticuerpo anti-PD-1 de la invención utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación, ensayos competitivos, agrupamiento de epítópicos y barrido de alanina. El anticuerpo de ensayo y un anticuerpo anti-PD-1 de la invención se pueden unir a al menos un resto común (p.ej., al menos dos, tres, cuatro o cinco restos comunes) en PD-1. Los restos de contacto en PD-1 pueden ser completamente idénticos entre el anticuerpo de ensayo y el anticuerpo anti-PD-1 de la invención. Se puede permitir que el anticuerpo anti-PD-1 de la invención se una a PD-1 en condiciones de saturación

y a continuación se mide la capacidad del anticuerpo de ensayo para unirse a PD-1. Si el anticuerpo de ensayo puede unirse a PD-1 al mismo tiempo que el anticuerpo anti-PD-1 de referencia, en ese caso el anticuerpo de ensayo se une a un epítopo diferente que el anticuerpo de referencia anti-PD-1. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de unirse a PD-1 al mismo tiempo, en ese caso el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítopo, un epítopo superpuesto, o un epítopo que está muy cerca del epítopo unido al anticuerpo anti-PD-1 de la invención. Este experimento se puede realizar utilizando ELISA, RIA, BIACORE™, Interferometría Bio-Capa o citometría de flujo. Para someter a ensayo si un anticuerpo anti-PD-1 compite de forma cruzada con otro anticuerpo anti-PD-1, se puede utilizar el método de competición descrito anteriormente en dos direcciones, es decir, determinar si el anticuerpo conocido bloquea el anticuerpo de ensayo y viceversa. Dichos experimentos de competición cruzada pueden realizarse, por ejemplo, utilizando un aparato IBIS MX96 SPR o el sistema Octet™.

El término "anticuerpo químérico" se refiere en su sentido más amplio a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos diferentes, típicamente un anticuerpo que es parcialmente de origen humano y parcialmente de origen no humano, es decir, obtenido en parte de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, rata u otro roedor, o un ave tal como un pollo. Los anticuerpos químéricos se prefieren sobre los anticuerpos no humanos con el fin de reducir el riesgo de una respuesta anti-anticuerpo humano, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón en el caso de un anticuerpo murino. Un ejemplo de un anticuerpo químérico típico es aquel en el que las secuencias del dominio variable son murinas mientras que las secuencias de la región constante son humanas. En el caso de un anticuerpo químérico, las partes no humanas pueden someterse a una alteración adicional para humanizar el anticuerpo. Los anticuerpos químéricos descritos en la presente memoria tienen secuencias de dominio variable de pollo y secuencias de región constante humanas.

El término "humanizar" se refiere al hecho de que cuando un anticuerpo es total o parcialmente de origen no humano (p.ej., un anticuerpo murino o de pollo obtenido a partir de la inmunización de ratones o pollos, respectivamente, con un antígeno de interés, o un anticuerpo químérico basado en tal anticuerpo murino o de pollo), es posible reemplazar ciertos aminoácidos, en particular en las regiones marco y las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, con el fin de evitar o minimizar una respuesta inmunitaria en seres humanos. Aunque no es posible predecir exactamente la inmunogenicidad y por lo tanto la respuesta anti-anticuerpo humana de un anticuerpo concreto, los anticuerpos no humanos tienden a ser más inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos humanos. Se ha demostrado que los anticuerpos químéricos, en los que se han reemplazados las regiones constantes foráneas (p.ej., de roedor o aviar) por secuencias de origen humano, son generalmente menos inmunogénicos que los anticuerpos de origen completamente foráneo, y la tendencia de los anticuerpos terapéuticos es hacia anticuerpos humanizados o completamente humanos. Los anticuerpos químéricos u otros anticuerpos de origen no humano pueden ser humanizados por tanto para reducir el riesgo de respuesta anti-anticuerpo humana.

Para los anticuerpos químéricos, la humanización típicamente implica la modificación de las regiones marco de las secuencias de dominio variable. Los restos de aminoácido que forman parte de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con mayor frecuencia no se alterarán en relación con la humanización, aunque en ciertos casos puede ser deseable alterar los restos de aminoácido de la CDR individual, por ejemplo, para eliminar un sitio de glicosilación, un sitio de desamidación, un sitio de isomerización de aspartato o un resto de cisteína o metionina no deseado. La glicosilación ligada a N se produce por la unión de una cadena de oligosacáridos a un resto de asparragina en la secuencia tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación se puede lograr mutando el resto Asn o Ser/Thr a un resto diferente, preferiblemente por medio de una sustitución conservativa. La desamidación de restos de asparragina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como el pH y la exposición superficial. Los restos de asparragina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando está presente en la secuencia Asn-Gly, y en menor medida en otras secuencias dipeptídicas tales como Asn-Ala. Cuando dicho sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, está presente en una secuencia de CDR, puede ser deseable eliminar el sitio, típicamente mediante sustitución conservativa para eliminar uno de los restos implicados.

Numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpo son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, la reseña de Almagro y Fransson, *Front Biosci.* 13:1619-1633 (2008). Un método comúnmente utilizado es el injerto de CDR, que para, por ejemplo, un anticuerpo químérico derivado murino implica la identificación de contrapartes del gen de la línea germinal humana de los genes del dominio variable murino y el injerto de las secuencias CDR murinas en este marco. La especificidad de la interacción de un anticuerpo con un antígeno diana reside principalmente en los restos de aminoácido localizados en las seis CDR de la cadena pesada y ligera. Las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son, por lo tanto, mucho más variables entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de un anticuerpo específico de origen natural, o más generalmente cualquier anticuerpo específico con una secuencia de aminoácidos determinada, por ejemplo, construyendo vectores de expresión que expresan secuencias de CDR a partir del anticuerpo específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente. Como resultado, es posible "humanizar" un anticuerpo no humano y aún mantener sustancialmente la especificidad de unión y la afinidad del anticuerpo original. El injerto de CDR puede basarse en las definiciones de CDR de Kabat, aunque una publicación más reciente (Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225 (2007)) ha sugerido que la definición de IMGT® (the international ImMunoGeneTics information system®, www.imgt.org) puede mejorar el resultado de la humanización (véase Lefranc et al., *Dev. Comp Immunol.*, 27:55-77 (2003)).

- En algunos casos, el injerto de CDR puede reducir la especificidad y afinidad de unión, y por lo tanto la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado con CDR en comparación con el anticuerpo parental a partir del que se obtienen las CDR. Se pueden introducir retromutaciones (a veces denominadas "reparación del marco") en posiciones seleccionadas del anticuerpo injertado con CDR, típicamente en las regiones marco, con el fin de restablecer la especificidad de unión y la afinidad del anticuerpo parental. La identificación de las posiciones para posibles retromutaciones se puede realizar utilizando la información disponible en la bibliografía y en las bases de datos de anticuerpos. Los restos de aminoácido que son candidatos para las retromutaciones son típicamente los que se encuentran en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras que los restos que están ocultos o que tienen un bajo grado de exposición superficial no serán alterados normalmente.
- Una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y a la retromutación es la remodelación, en la que se retienen restos no expuestos en la superficie de origen no humano, mientras que los restos de la superficie se alteran a restos humanos.
- En ciertos casos, también puede ser deseable alterar uno o más restos de aminoácido de la CDR para mejorar la afinidad de unión al epítopo diana. Esto se conoce como "maduración de afinidad" y puede realizarse opcionalmente en relación con la humanización, por ejemplo, en situaciones donde la humanización de un anticuerpo conduce a reducción de la especificidad o de la afinidad de unión y no es posible mejorar suficientemente la especificidad o la afinidad de unión solo mediante retromutaciones. Se conocen en la técnica diversos métodos de maduración por afinidad, por ejemplo, el método de mutagénesis por saturación de barrido *in vitro* descrito por Burks et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:412-417 (1997), y el método de maduración por afinidad *in vitro* por etapas de Wu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6037-6042 (1998).
- El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se emplea en la presente memoria, se refiere a una o más porciones o fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p.ej., PD-1 humana, o una porción del mismo). Se ha demostrado que ciertos fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unión al antígeno del anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" incluyen (i) un fragmento Fab: un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 (p.ej., los fragmentos Fab 12819.17149 y 12865.17150 descritos a continuación); (ii) un fragmento $F(ab')_2$: un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1 ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada capaz de unirse específicamente a un antígeno. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que los dominios V_L y V_H se unen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). También dentro de la invención existen moléculas de unión a antígeno que comprenden un V_H y/o un V_L . En el caso de un V_H , la molécula puede comprender también uno o más de una región CH1, bisagra, CH2, o CH3. También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla se incluyan dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y la creación de dos sitios de unión a antígeno.
- Las porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina de anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, porciones de anticuerpos y moléculas de inmunoadherencia utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, como se describe en la presente memoria.
- La clase (isotipo) y la subclase de anticuerpos anti-PD-1 se pueden determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo se pueden determinar utilizando anticuerpos que son específicos para una clase y una subclase concretas de anticuerpo. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y la subclase pueden determinarse mediante ELISA, Transferencia Western y otras técnicas.
- Alternativamente, la clase y la subclase pueden determinarse secuenciando la totalidad o una parte de las regiones constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y la subclase de los anticuerpos.
- Cuando se hace referencia a restos de aminoácido concretos en una posición determinada de una secuencia de anticuerpo, una indicación de, por ejemplo, "35S" se refiere a la posición y resto, es decir, en este caso indica que está presente un resto de serina (S) en la posición 35 de la secuencia. De forma similar, una indicación de, por ejemplo, "13Q+35S" se refiere a los dos restos en las posiciones respectivas.
- A menos que se indique lo contrario, todos los números de restos de aminoácido del anticuerpo a los que se hace referencia en esta descripción son aquellos bajo el esquema de numeración IMGT®.

Anticuerpos anti-PD-1

La presente invención proporciona anticuerpos dirigidos contra PD-1 como se define en las reivindicaciones y porciones de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos pueden ser quiméricos, con dominios variables derivados de pollos, y regiones constantes humanas, o pueden ser humanizados. Los anticuerpos descritos en la 5 presente memoria son en particular anticuerpos humanizados.

Las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L (SEQ ID NO: 2 a 17) de ocho anticuerpos anti-PD-1 humanizados seleccionados se muestran más abajo en la Tabla 4 (Ejemplo 4). Como referencia, los SEQ ID NO. se proporcionan a continuación en la Tabla 1.

10 Los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente memoria pueden referirse a un número de 5 dígitos, p.ej., "12819", o a un número de 10 dígitos, por ejemplo, "12819.15384". Según se utiliza en la presente memoria, el número de 5 dígitos se refiere a todos los anticuerpos que tienen las secuencias de CDR1-3 de cadena pesada y ligera mostradas para ese número en la Tabla 2, mientras que el uso de un número de 10 dígitos se refiere a una variante humanizada concreta. Por ejemplo, 12819.15384 es una variante humanizada concreta que tiene las secuencias de CDR de un anticuerpo 12819 como se muestra en la Tabla 2. El número de 5 dígitos abarca, por ejemplo, anticuerpos que son idénticos a las variantes de 10 dígitos que se muestran a continuación en la Tabla 1, excepto algunos cambios en las FR (p. ej., que carecen de los restos SY en el extremo N terminal de la cadena ligera madura, o que tienen restos SS en lugar de SY). Estas modificaciones no cambian las propiedades funcionales (p. ej., unión a antígeno) de los anticuerpos.

15

20 Tabla 1 SEQ ID NO para las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados anti-PD-1

Anticuerpo	V_H	V_L
12819.15384	2	3
12748.15381	4	5
12748.16124	4	66
12865.15377	6	7
12892.15378	8	9
12796.15376	10	11
12777.15382	12	13
12760.15375	14	15
13112.15380	16	17

La Tabla 2 siguiente proporciona los SEQ ID NO para las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y ligera de los anticuerpos.

25 Tabla 2 SEQ ID NO para las secuencias de aminoácidos de CDR de anticuerpos anti-PD-1

Anticuerpo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
12819	18	19	20	21	22	23
12748	24	25	26	27	28	29
12865	30	31	32	33	34	35
12892	36	37	38	39	40	41
12796	42	43	44	45	46	47
12777	48	49	50	51	52	53
12760	54	55	56	57	58	59
13112	60	61	62	63	64	65

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18-20, respectivamente;
- 5 b) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- c) un anticuerpo cuya V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67;
- e) un anticuerpo cuyas L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 21-23, respectivamente;
- 10 f) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- g) un anticuerpo cuya V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- h) un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68;
- 15 i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18-23, respectivamente;
- j) un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia idéntica al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y cuyo V_L tiene una secuencia idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- 20 k) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y
- l) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24-26, respectivamente;
- 25 b) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
- c) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;
- d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67;
- 30 e) un anticuerpo cuyas L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 27-29, respectivamente;
- f) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66;
- 35 g) un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66;
- h) un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68;
- i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24-29, respectivamente;
- 40 j) un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66;
- k) un anticuerpo cuyo V_H comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y cuyo V_L comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66; y
- 45 l) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66 y SEQ ID NO: 68.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en el presente documento se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30-32, respectivamente;
- 5 b) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- c) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67;
- e) un anticuerpo cuyas L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 33-35, respectivamente;
- 10 f) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- g) un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- h) un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68;
- 15 i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30-35, respectivamente;
- j) un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- 20 k) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y
- l) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36-38, respectivamente;
- 25 b) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- c) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67;
- 30 e) un anticuerpo cuyas L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39-41, respectivamente;
- f) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- g) un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- 35 h) un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68;
- i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36-41, respectivamente;
- j) un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- 40 k) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y
- l) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68.

45 Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 42-44, respectivamente;
- b) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;
- 5 c) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;
- d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67;
- e) un anticuerpo cuyas L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 45-47, respectivamente;
- 10 f) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
- g) un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
- h) un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 68;
- i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 42-47, respectivamente;
- 15 j) un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;
- k) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y
- 20 l) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 68.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 48-50, respectivamente;
- b) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- 25 c) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67;
- e) un anticuerpo cuyas L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51-53, respectivamente;
- 30 f) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- g) un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- h) un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68;
- 35 i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 48-53, respectivamente;
- j) un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- 40 k) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y
- l) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- 45 a) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 54-56,

respectivamente;

- b) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- c) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
- 5 d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67;
- e) un anticuerpo cuyas L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 57-59, respectivamente;
- f) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- 10 g) un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- h) un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68;
- i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 54-59, respectivamente;
- 15 j) un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;
- k) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y
- 20 l) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria se puede seleccionar del grupo que consiste en:

- a) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-62, respectivamente;
- b) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- 25 c) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67;
- e) un anticuerpo cuyas L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 63-65, respectivamente;
- 30 f) un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- g) un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- h) un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68;
- 35 i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-65, respectivamente;
- j) un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- 40 k) un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- l) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12819 (p.ej., anticuerpo 12819.15384).

- 45 Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden

las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12748 (p.ej., anticuerpo 12748.15381 o anticuerpo 12748.16124).

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12865 (p.ej., anticuerpo 12865.15377).

5 Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12892 (p.ej., anticuerpo 12892.15378).

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12796 (p.ej., anticuerpo 12796.15376).

10 Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12777 (p.ej., anticuerpo 12777.15382).

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12760 (p.ej., anticuerpo 12760.15375).

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 13112 (p.ej., anticuerpo 13112.15380).

15 En otra realización, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo tiene un V_H y un V_L que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 90% (p.ej., al menos 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) a la de V_H y V_L , respectivamente del anticuerpo 12819.15384.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo tiene un V_H y un V_L que comprenden las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L , respectivamente del anticuerpo 12819.15384.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22 y 23, respectivamente.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de:

a) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 y 29, respectivamente;

25 b) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 y 35, respectivamente;

c) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente;

d) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46 y 47, respectivamente;

e) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 y 53, respectivamente;

f) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 y 59, respectivamente; o

30 g) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 y 65, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden un V_H que es idéntico en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, y un V_L que es idéntico en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente.

35 Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden un V_H que es idéntico en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, y un V_L que es idéntico en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, a las secuencias de aminoácidos de:

a) SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente;

b) SEQ ID NO: 4 y 66, respectivamente;

40 c) SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente;

d) SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente;

e) SEQ ID NO: 10 y 11, respectivamente;

f) SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente;

g) SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente; o

h) SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden un V_H y un V_L que son las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria o una porción de unión a antígeno del mismo comprenden un V_H y un V_L que son las secuencias de aminoácidos de:

- a) SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 4 y 66, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente;
- 10 e) SEQ ID NO: 10 y 11, respectivamente;
- f) SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente; o
- h) SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68.

Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria comprende:

- a) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y 68;
- b) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y 68;
- 20 c) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68;
- d) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68;
- 25 e) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 68;
- f) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68;
- 30 g) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68; o
- h) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68.

35 Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria comprende:

- a) una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y 68;
- b) una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y 68;
- 40 c) una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68;
- d) una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68;
- e) una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67 y una LC que consiste en las

secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 11 y 68;

- f) una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68;
- 5 g) una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68; o
- h) una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de la invención puede tener al menos una de las siguientes propiedades:

- 10 a) se une a PD-1 humana con una K_D de 750 pM o menos;
- b) se une a PD-1 de cinomolgo con una K_D de 7 nM o menos;
- c) se une a PD-1 de ratón con una K_D de 1 nM o menos;
- d) no se une a PD-1 de rata;
- e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo de sangre completa SEB;
- 15 f) aumenta la secreción de IFN-γ en un ensayo de reacción mixta linfocitaria unidireccional;
- g) inhibe la interacción de PD-1 con PD-L1 en al menos 60% a una concentración de 10 µg/ml en un ensayo competitivo de citometría de flujo;
- h) bloquea la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 en al menos un 90% a una concentración de 10 µg/ml según se determina por análisis de interferometría de Bio-Capa; e
- 20 i) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de la invención pueden unirse a PD-1 humana con una K_D de al menos 900, al menos 850, al menos 800, al menos 750, al menos 700, al menos 650, al menos 600, al menos 550, al menos 500, al menos 450, al menos 400, al menos 350, al menos 300, al menos 250, al menos 200, al menos 150, en al menos 100, al menos 50, al menos 40, al menos 30 o al menos 20 pM. En ciertas realizaciones, la K_D se determina utilizando resonancia de plasmón superficial. En realizaciones concretas, los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno se unen a PD-1 humana con una afinidad más alta que nivolumab, pembrolizumab, o ambos.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de la invención se pueden unir a PD-1 de cinomolgo (SEQ ID NO: 89) con una K_D de al menos 9000, al menos 8000, al menos 7000, al menos 6000, al menos 5000, al menos 4000, al menos 3000, al menos 2500, al menos 2000, al menos 1500, al menos 1000, al menos 900, al menos 800, al menos 700, al menos 600, al menos 500, al menos 400, al menos 300, al menos 200, al menos 100, al menos 75, al menos 50, al menos 25, al menos 20, al menos 15, al menos 10 o al menos 5 pM. En ciertas realizaciones, la K_D se determina utilizando resonancia de plasmón superficial.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de la invención se pueden unir a PD-1 de ratón (SEQ ID NO: 91) con una K_D de al menos 1000, al menos 950, al menos 900, o al menos 850 pM. En ciertas realizaciones, la K_D se determina utilizando resonancia de plasmón superficial.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de la invención puede inhibir la interacción de PD-1 con PD-L1 en al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% a una concentración de 10 µg/ml en un análisis competitivo de citometría de flujo. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno pueden inhibir la interacción de PD-1 con PD-L1 en al menos 83%.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de la invención pueden bloquear la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 en al menos 20%, al menos 30%, a al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, a al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% a una concentración de 10 µg/ml según se determina mediante análisis de Interferometría de Bio-Capa. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o las porciones de unión a antígeno bloquean la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 en al menos 90%.

- Cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno descritos en la presente pueden competir o competir de manera cruzada por la unión a PD-1 con los anticuerpos 12865, 12892 y 12777 (p.ej., anticuerpos 12865.15377, 12892.15378 y 12777.15382). Cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno descritas en la presente memoria pueden competir o competir de manera cruzada por la unión a PD-1 con un anticuerpo 12819 (p.ej., anticuerpo 12819.15384). Cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno descritas en la presente memoria pueden competir o competir de manera cruzada por la unión a PD-1 con los anticuerpos 12760 y 13112 (p.ej., anticuerpos 12760.15375 y 13112.15380).
- Un anticuerpo anti-PD-1 divulgado en la presente memoria, o una porción de unión a antígeno del mismo, se unen a un epítopo de PD-1 que incluye al menos uno (p.ej., al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco) de los siguientes restos de SEQ ID NO: 1: V44, V64, L128, P130, K131, A132, E136 y T145. El anticuerpo de la invención o porción de unión a antígeno se unen a un epítopo de PD-1 que incluye los restos V64, L128, P130, K131 y A132 de SEQ ID NO: 1 (tal como un anticuerpo 12819, por ejemplo, el anticuerpo 12819.15384). Un anticuerpo divulgado en la presente memoria o porción de unión a antígeno se unen a un epítopo de PD-1 que incluye los restos K131 y E136 de SEQ ID NO: 1 (tal como un anticuerpo 12865, por ejemplo, el anticuerpo 12865.15377). Un anticuerpo divulgado en la presente memoria o porción de unión a antígeno se unen a un epítopo de PD-1 que incluye los restos V44 y T145 de SEQ ID NO: 1 (tal como un anticuerpo 13112, por ejemplo, el anticuerpo 13112.15380).
- En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, se unen a un epítopo de PD-1 que comprende los restos 56-64, 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1. Un anticuerpo divulgado en la presente memoria o porción de unión a antígeno se unen a un epítopo de PD-1 que comprende los restos 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (tales como los anticuerpos 12865, p.ej., el anticuerpo 12865.15377). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno se unen a un epítopo de PD-1 que comprende los restos 56-64, 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819). Un anticuerpo divulgado en la presente memoria o porción de unión a antígeno se unen a un epítopo de PD-1 que comprende los restos 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12865). Un anticuerpo divulgado en la presente memoria o porción se unen a los restos 69-75 (o un fragmento del mismo, tal como un fragmento, de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de restos), de SEQ ID NO: 1 (tales como los anticuerpos 12865, p.ej., el anticuerpo 12865.15377). Un anticuerpo divulgado en la presente memoria o porción se unen a los restos 136-140 (o un fragmento del mismo, tal como un fragmento de uno, dos, tres o cuatro restos) de SEQ ID NO: 1 (tales como los anticuerpos 12865, p.ej., el anticuerpo 12865.15377). Un anticuerpo divulgado en la presente memoria o porción se unen a los restos 69-75 (o un fragmento del mismo) y los restos 136-140 (o un fragmento del mismo) de SEQ ID NO: 1 (tales como los anticuerpos 12865, p.ej., el anticuerpo 12865.15377). También se contempla un epítopo con cualquier combinación de los restos anteriores.
- Se puede utilizar como inmunógeno una secuencia de aminoácidos que comprende un epítopo de PD-1 como se describe en la presente memoria (p.ej., administrado a un animal o en forma de antígeno para escrutar bibliotecas de anticuerpos) para generar o identificar anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen a dicho epítopo.
- La clase de un anticuerpo anti-PD-1 obtenido mediante los métodos descritos en la presente memoria se puede reemplazar o cambiar por otra clase o subclase. En un aspecto de la invención, una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se aísla utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica de manera que no incluya secuencias de ácidos nucleicos que codifican C_L o C_H . Las moléculas de ácido nucleico que codifican V_L o V_H se conectan operativamente a continuación a una secuencia de ácido nucleico que codifica una C_L o C_H , respectivamente, de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto se puede lograr utilizando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H , como se describió anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 que originalmente era IgM se puede cambiar de clase a IgG. Además, el cambio de clase se puede utilizar para convertir una subclase IgG en otra, p.ej., de IgG₁ a IgG₂. Una región constante de cadena ligera κ se puede reemplazar por una región constante de cadena ligera λ . Un método preferido para producir un anticuerpo de la invención con un isotipo de Ig deseado comprende las etapas de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anti-PD-1 anticuerpo, obtener el dominio variable de la cadena pesada, ligar el dominio variable de la cadena pesada con la región constante de una cadena pesada del isotipo deseado, expresar la cadena ligera y la cadena pesada ligadas en una célula, y recoger el anticuerpo anti-PD-1 con el isotipo deseado.
- El anticuerpo anti-PD-1 de la invención puede ser una IgG, una IgM, una IgE, una IgA o una IgD, pero típicamente es del isotipo IgG, p.ej., de la subclase de IgG IgG₁, IgG_{2a} o IgG_{2b}, IgG₃ o IgG₄. En una realización, el anticuerpo es una IgG₁. En otra realización, el anticuerpo es una IgG₄.
- En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 puede comprender al menos una mutación en la región Fc. Se conocen varias mutaciones de Fc diferentes, donde estas mutaciones proporcionan una alteración de la función efectora. Por ejemplo, en muchos casos será deseable reducir o eliminar la función efectora, p.ej., cuando no se desean interacciones ligando/receptor o en el caso de productos conjugados de anticuerpo-fármaco.
- En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende al menos una mutación en la región Fc que reduce la función efectora. Las posiciones de aminoácidos de la región Fc que puede ser ventajoso mutar con el fin de reducir la función efectora incluyen una o más de las posiciones 228, 233, 234 y 235, donde las posiciones de aminoácidos se numeran

de acuerdo con el esquema de numeración IMGT®.

En una realización, uno o ambos restos de aminoácido en las posiciones 234 y 235 pueden estar mutados, por ejemplo, de Leu a Ala (L234A/L235A). Estas mutaciones reducen la función efectora de la región Fc de los anticuerpos IgG1. Adicionalmente o alternativamente, el resto de aminoácido en la posición 228 puede mutarse, p.ej., a Pro. En otra

5 realización, el resto de aminoácido en la posición 233 puede mutarse, p.ej., a Pro, el resto de aminoácido en la posición 234 puede mutarse, p.ej., a Val, y/o el resto de aminoácido en la posición 235 puede mutarse, p.ej., a Ala. Las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el esquema de numeración IMGT®.

En otra realización, cuando el anticuerpo es de la subclase IgG4, éste puede comprender la mutación S228P, es decir, tiene una prolina en la posición 228, donde la posición de aminoácidos se numera de acuerdo con el esquema de 10 numeración IMGT®. Se sabe que esta mutación reduce el intercambio de brazos Fab no deseados.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención puede ser parte de una molécula de inmunoadherencia más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadherencia incluyen el uso de la región central de estreptavidina para formar una molécula de scFv tetramérica (Kipriyanov et al.,

15 *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.*, 31:1047-1058 (1994)). Otros ejemplos incluyen cuando una o más CDR de un anticuerpo se incorporan a una molécula, ya sea covalentemente o no covalentemente, para convertirla en una inmunoadhesina que se une específicamente a un antígeno de interés. Las CDR se pueden incorporar como parte de una cadena polipeptídica 20 más grande, se puede conectar covalentemente a otra cadena polipeptídica, o se puede incorporar no covalentemente.

En otra realización, se puede preparar un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que comprende la totalidad o una parte de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención conectado a otro polipéptido. En ciertas realizaciones, solo están conectados al polipéptido los dominios variables del anticuerpo anti-PD-1. En ciertas realizaciones, el VH de un anticuerpo anti-PD-1 está conectado a un primer polipéptido, mientras que el VL de un anticuerpo anti-PD-1 está 25 conectado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de tal manera que los dominios VH y VL puedan interactuar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno.

En otra realización preferida, el dominio VH está separado del dominio VL por un conector de manera que los dominios VH y VL pueden interactuar unos con otros (p.ej., anticuerpos de cadena única). El anticuerpo VH -conector- VL se conecta después al polipéptido de interés. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que se conectan entre sí dos (o más) anticuerpos de cadena única. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente 30 en una única cadena polipeptídica, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

Para crear un anticuerpo de cadena única (scFv), los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se conectan operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, p.ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4 -Ser)3, de manera que las secuencias de VH y VL se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con los dominios VL y VH unidos por el conector flexible. Véanse, p.ej., Bird et al., *Science* 242:423-426 35 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); y McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si solo se utiliza un único VH y VL; bivalente, si se utilizan dos VH y VL; o polivalente, si se utilizan más de dos VH y VL. Se pueden generar anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente a PD-1 humana y a otra molécula, por ejemplo.

40 En otras realizaciones, se pueden preparar otros anticuerpos modificados utilizando moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpo anti-PD-1. Por ejemplo, se pueden preparar "anticuerpos kappa" (III et al., *Protein Eng.* 10:949-57 (1997)), "minibodies" (Martin et al., *EMBO J.* 13:5303-9 (1994)), "fragmentos bivalentes (diabodies)" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)) utilizando técnicas de biología molecular convencionales 45 siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

Un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno de la invención puede derivatizarse o unirse a otra molécula (p.ej., otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o porciones de los mismos se derivatizan de manera que la unión a PD-1 no se ve afectada adversamente por la derivatización o el marcaje. Por consiguiente, se pretende que los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención incluyan tanto las formas intactas como las modificadas de 50 los anticuerpos anti-PD-1 humanos. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede unir funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (p.ej., un anticuerpo biespecífico o un fragmento bivalente), un agente de detección, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

55 Se produce un tipo de anticuerpo derivatizado mediante entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, p.ej., para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador

apropiado (p.ej., éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (p.ej., suberato de disuccinimidilo). Dichos conectores están disponibles, p.ej., de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Un anticuerpo anti-PD-1 también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, p.ej., para aumentar la semivida en el suero.

También se puede marcar un anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Según se utiliza en la presente memoria, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la incorporación de otra molécula al anticuerpo. En una realización, la marca es un marcador detectable, p.ej., la incorporación de un aminoácido radiomarcado o el anclaje a un polipéptido de radicales biotinilo que pueden detectarse mediante avidina marcada (p.ej., estreptavidina que

10 contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorímetricos). En otra realización, la marca o el marcador pueden ser agentes terapéuticos, p.ej., un producto conjugado de fármaco o toxina. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas y se pueden utilizar. Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

15 radioisótopos o radionúclidos (p.ej., ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcas fluorescentes (p.ej.,

FITC, rodamina, fósforos basados en lantánidos), marcas enzimáticas (p.ej., peroxidasa de rábano picante, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotinilo, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p.ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como la toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina

20 D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunas realizaciones, las marcas están unidas por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

25 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden estar presentes en una forma neutra (incluyendo formas zwitterísticas) o como una especie cargada positiva o negativamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden complejarse con un contraíón para formar una sal farmacéuticamente aceptable.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraíones, en donde los contraíones se obtienen de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Moléculas de unión biespecífica

En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión biespecífica que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención y la especificidad de unión de otro anticuerpo anti-PD-1 (p.ej., otro anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente memoria) o un anticuerpo que se dirige a una proteína diferente, tal como otra proteína inmunitaria de punto de control, un antígeno canceroso u otra molécula de superficie celular cuya actividad interviene en un estado de enfermedad tal como cáncer. Tales moléculas de unión biespecíficas son conocidas en la técnica, y ejemplos de diferentes tipos de moléculas de unión biespecíficas se proporcionan en otra parte de la presente memoria.

Moléculas de ácidos nucleicos y vectores

40 La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico y secuencias que codifican anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención. En algunas realizaciones, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo. En otras realizaciones, la misma molécula de ácido nucleico codifica las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo.

45 Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, debe entenderse que una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia concreta abarca su cadena complementaria, con su secuencia complementaria. El término "polinucleótido" como se ha mencionado en la presente memoria significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de hebra sencilla y doble.

50 También se divultan en la presente memoria secuencias de nucleótidos que son idénticas en al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% a una o más secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente memoria, por ejemplo, a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69-88. El término "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos se refiere a los restos en dos secuencias que son las mismas cuando se alinean para una correspondencia máxima. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede estar en un tramo de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más habitualmente al menos aproximadamente 24

nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos, y preferiblemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Existen varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden utilizarse para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden comparar utilizando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas de Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, p.ej., los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias problema y de búsqueda (véanse, p.ej., Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); y Pearson, *J. Mol. Biol.* 276: 71 - 84 (1998)). A menos que se especifique lo contrario, se utilizan los parámetros predeterminados para un programa o algoritmo concreto. Por ejemplo, se puede determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico utilizando FASTA con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o utilizando Gap con sus parámetros predeterminados proporcionados en GCG Versión 6.1.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69 y 70.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, se pueden aislar las moléculas de ácido nucleico.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector adecuado para expresar una de las cadenas de un anticuerpo de la invención o porción de unión a antígeno del mismo. El término "vector", como se emplea en la presente memoria, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunas realizaciones, el vector es un plásmido, es decir, una pieza circular de doble hebra de ADN en la que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales al genoma viral. En algunas realizaciones, los vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p.ej., vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). En otras realizaciones, los vectores (p.ej., vectores de mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo se replican junto con el genoma del anfitrión. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están conectados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

La invención proporciona vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención o una porción de unión a antígeno de la misma, la cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención o una porción de unión a antígeno de la misma, o tanto las cadenas pesada como ligera de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención o una porción de unión a antígeno de las mismas. La invención proporciona adicionalmente vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos y sondas de los mismos.

Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno de las mismas de la invención pueden aislarse de cualquier fuente que produzca dicho anticuerpo o porción. Las moléculas de ácido nucleico se pueden aislar de células B que expresan un anticuerpo anti-PD-1 aislado de un animal inmunizado con un antígeno PD-1 humana, o de una célula inmortalizada producida a partir de dicha célula B. Los métodos para aislar ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. El ARNm se puede aislar y utilizar para producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la clonación de ADNc de genes de anticuerpos. En ciertas realizaciones, se puede sintetizar en lugar de aislar una molécula de ácido nucleico de la invención.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_H de un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno de la invención unida en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena pesada de cualquier fuente. Del mismo modo, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_L de un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno de la invención unida en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena ligera de cualquier fuente.

En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesada (V_H) y/o ligera (V_L) se pueden "convertir" en genes de anticuerpos completos. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H o V_L se convierten en genes de anticuerpos completos mediante la inserción en un vector de expresión que ya codifican dominios constantes de cadena pesada (CH) o constantes de cadena ligera (CL), respectivamente, de manera que el segmento V_H está conectado operativamente al segmento CH dentro del vector, y/o el segmento V_L está conectado operativamente al segmento CL dentro del vector. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H y/o V_L se convierten en genes de anticuerpos completos conectando, p.ej., ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio V_H y/o V_L a una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio CH y/o CL utilizando técnicas de biología molecular convencionales. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y/o ligeras completas se pueden expresar a continuación a partir de una célula en la que se han introducido y aislar el anticuerpo

anti-PD-1.

Las moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para expresar de forma recombinante grandes cantidades de anticuerpos anti-PD-1. Las moléculas de ácido nucleico también pueden utilizarse para producir anticuerpos químicos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena sencilla, inmunoadhesinas, anticuerpos bivalentes, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe en la presente memoria.

En otra realización, una molécula de ácido nucleico de la invención se utiliza como sonda o cebador de PCR para una secuencia de anticuerpo específica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede utilizarse como una sonda en métodos de diagnóstico o como un cebador de PCR para amplificar regiones de ADN que podrían utilizarse, entre otros, para aislar moléculas adicionales de ácido nucleico que codifican dominios variables de anticuerpos anti-PD-1. En algunas

realizaciones, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos. Los oligonucleótidos divulgados en la presente memoria pueden provenir de dominios altamente variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de interés. Los oligonucleótidos divulgados en la presente memoria pueden codificar la totalidad o una parte de una o más de las CDR de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención como se describe en la presente memoria.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico y los vectores pueden utilizarse para producir anticuerpos anti-PD-1 mutados. Los anticuerpos pueden estar mutados en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, p.ej., para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, se puede realizar una mutación en una o más de las CDR para aumentar o disminuir la K_D del anticuerpo anti-PD-1, para aumentar o disminuir k_{off} , o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. En otra realización, se realizan una o más mutaciones en un resto de aminoácido que se sabe que se ha cambiado en comparación con la línea germinal en un anticuerpo monoclonal de la invención. Las mutaciones se pueden realizar en una CDR o región de marco de un dominio variable, o en una región constante. En una realización preferida, las mutaciones se realizan en un dominio variable. En algunas realizaciones, se realizan una o más mutaciones en un resto de aminoácido que se sabe que se ha cambiado en comparación con la línea germinal en una CDR o región marco de un dominio variable de un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención.

En otra realización, la región o regiones marco se mutan de modo que la región o regiones marco resultantes tengan la secuencia de aminoácidos del gen correspondiente de la línea germinal. Se puede realizar una mutación en una región marco o región constante para aumentar la semivida del anticuerpo anti-PD-1. Véase, p.ej., la publicación PCT WO 00/09560. También se puede realizar una mutación en una región marco o región constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo y/o para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente a otra molécula. De acuerdo con la invención, un único anticuerpo puede tener mutaciones en una cualquiera o más de las CDR o regiones marco del dominio variable o en la región constante.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos se expresan insertando ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o completa, obtenidas como se describió anteriormente, en vectores de expresión tales que los genes se conectan operativamente a secuencias de control de la expresión necesarias tales como secuencias de control transcripcionales y traduccionales. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas tales como virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV. La secuencia codificante del anticuerpo se puede ligar a un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y traducción dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y la traducción de la secuencia codificante del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se pueden elegir para que sean compatibles con la célula anfitriona de expresión utilizada. La secuencia codificante de la cadena ligera del anticuerpo y la secuencia codificante de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados, y se pueden conectar operativamente a la misma o a diferentes secuencias de control de la expresión (p.ej., promotores). En una realización, ambas secuencias codificantes se insertan en el mismo vector de expresión, y se pueden conectar operativamente a las mismas secuencias de control de expresión (p.ej., un promotor común), separar secuencias de control de expresión idénticas (p.ej., promotores) o a diferentes secuencias de control de la expresión (p.ej., promotores). Las secuencias codificantes de anticuerpos se pueden insertar en el vector de expresión por medio de métodos convencionales (p.ej., ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción).

Un vector conveniente es aquel que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados de manera que cualquier secuencia V_H o V_L pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se describió anteriormente. Los genes que codifican HC y LC en dichos vectores pueden contener secuencias de intrones que darán como resultado aumentos de rendimientos globales de proteína de anticuerpo estabilizando el ARNm relacionado. Las secuencias intrónicas están flanqueadas por sitios donadores de empalme y aceptores de empalme, que determinan dónde se producirá el empalme del ARN. La ubicación de las secuencias intrónicas puede ser en regiones variables o constantes de las cadenas de anticuerpos, o en ambas regiones variables y constantes cuando se utilizan intrones múltiples. La poliadenilación y la terminación de la transcripción se pueden producir en sitios cromosómicos nativos aguas abajo de las regiones codificantes. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula anfitriona. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el

péptido señal se une en marco al extremo amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulínica).

5 Además de los genes de la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula anfitriona. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se vaya a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células anfitrionas de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), el Virus de Simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (p.ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), poliomavirus y promotores de mamíferos fuertes tales como promotores nativos de inmunoglobulina y actina. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales, y las secuencias de los mismos, véanse, p.ej., las patentes de los Estados Unidos Núm. 5.168.062, 10 4.510.245 y 4.968.615. Los métodos para expresar anticuerpos en plantas, que incluyen una descripción de promotores y vectores, así como la transformación de plantas, son conocidos en la técnica. Véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 6.517.529. Los métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, 15 p.ej., células de levadura, también son bien conocidos en la técnica.

20 Además de los genes de la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (p.ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células anfitrionas en las que se ha introducido el vector (véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula anfitriona en la que se ha introducido el vector. Por ejemplo, los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células anfitrionas dhfr con selección/amplificación con metotrexato), 25 el gen neo (para selección con G418) y el gen de la glutamato sintetasa.

30 El término "secuencia de control de la expresión" como se emplea en la presente memoria significa secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de iniciación, terminación, 35 promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásico; secuencias que mejoran la eficacia de traducción (es decir, la secuencia consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desee, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo anfitrón; en procariotas, tales secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, en general, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

Células anfitrionas y métodos de producción de anticuerpos y composiciones de anticuerpos

45 Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos para producir las composiciones anticuerpos y los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención. Una realización de este aspecto de la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende proporcionar una célula anfitriona recombinante capaz de expresar el anticuerpo, cultivar dicha célula anfitriona en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y aislar el anticuerpo resultante. Los anticuerpos producidos mediante tal expresión en tales células anfitrionas recombinantes se denominan en la presente memoria "anticuerpos recombinantes". La invención también proporciona células de la progenie de tales células anfitrionas, y anticuerpos producidos por las mismas.

50 El término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), como se emplea en la presente memoria, significa una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La invención proporciona células anfitrionas que comprenden un vector de acuerdo con la invención descrito anteriormente. La invención también proporciona células anfitrionas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo de la invención. Debe entenderse que "célula anfitriona recombinante" y "célula anfitriona" significan no solo la célula sujeta particular sino también la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones subsiguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluye dentro del alcance del término "célula anfitriona" como se emplea en la presente memoria.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-PD-1 y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar para la transfección de una célula anfitriona de mamífero, vegetal, bacteriana o de levadura adecuada. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula anfitriona. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de polinucleótidos en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir en células de mamífero mediante vectores virales. Los métodos de transformación de células son bien conocidos en la técnica. Véanse, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. Los métodos de transformación de células vegetales son bien conocidos en la técnica, incluyendo, p.ej., transformación mediada por Agrobacterium, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los métodos de transformación de células bacterianas y de levadura también son bien conocidos en la técnica.

Las líneas celulares de mamíferos disponibles como anfitriones para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Colección (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células Freestyle 293 (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono africano verde (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p.ej., Hep G2), células A549 y varias otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que se pueden utilizar son líneas celulares de insectos, tales como las células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos son introducidos en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se han cultivado las células anfitrionas. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales. Las células anfitrionas de vegetales incluyen, p.ej., *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células anfitrionas bacterianas incluyen E. coli y especies de *Streptomyces*. Las células anfitrionas de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Adicionalmente, la expresión de anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos a partir de líneas celulares de producción se puede mejorar utilizando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión génica de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para mejorar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se analiza en su totalidad o en parte en relación con las patentes EP 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferentes patrones de glicosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en la presente memoria, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria son parte de la presente invención, independientemente del estado de glicosilación de los anticuerpos, y más generalmente, independientemente de la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales.

Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo (o como único ingrediente activo) un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo o composición de anticuerpo anti-PD-1 de la invención. La composición farmacéutica puede comprender cualquier composición de anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones están destinadas a la mejora, prevención y/o tratamiento de un trastorno relacionado con PD-1 (p.ej., un trastorno caracterizado por la expresión en exceso o la hiperactividad de PD-1) y/o cáncer. En algunas realizaciones, las composiciones están destinadas a la activación del sistema inmunitario. En ciertas realizaciones, las composiciones están destinadas a la mejora, prevención y/o tratamiento del cáncer que se origina en tejidos tales como piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, el sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas.

Generalmente, los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos son adecuados para administrarse como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, p.ej., como se describe a continuación.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenderán uno o más anticuerpos o porciones de unión anti-PD-1 de la invención, p.ej., uno o dos anticuerpos o porciones de unión anti-PD-1. En una realización, la composición comprende un único anticuerpo anti-PD-1 de la invención o porción de unión del mismo.

En otra realización, la composición farmacéutica puede comprender al menos un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo, p.ej., un anticuerpo o porción anti-PD-1 y uno o más anticuerpos adicionales que se dirigen a uno o receptores de superficie celular más relevantes, p.ej., uno o más receptores relevantes para el cáncer.

El término "excipiente" se utiliza en la presente memoria para describir cualquier ingrediente distinto del compuesto o los compuestos de la invención. La elección del excipiente o los excipientes dependerá en gran medida de factores tales como el modo concreto de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación. Según se utiliza en la presente memoria, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos

- 5 y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos, que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, p.ej., azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.
- 10 Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o eficacia del anticuerpo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y los métodos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Tales composiciones y métodos para su preparación se pueden encontrar, 15 por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19^a Edición (Mack Publishing Company, 1995). Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones GMP (buenas prácticas de fabricación).

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar o comercializar a granel, como una única dosis unitaria, o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Según se utiliza en la presente memoria, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del 20 ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, p.ej., la mitad o una tercera parte de dicha dosificación.

Cualquier método para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos aceptados en la técnica puede emplearse adecuadamente para los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de la invención.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención son típicamente adecuadas para administración parenteral. Según se utiliza en la presente memoria, la "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada por ruptura física de un tejido de un sujeto y administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido, lo que generalmente da como resultado la administración directa al torrente sanguíneo, al músculo o a un órgano interno. La administración parenteral incluye así, la administración de 30 una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido. En particular, se contempla la administración parenteral que incluye inyección o infusions subcutáneas, intraperitoneales, intramusculares, intraesternales, intravenosas, intraarteriales, intratecales, 35 intraventriculares, intrauretrales, intracraneales e intrasinoviales; y técnicas de infusión de diálisis renal. También se contempla la perfusión regional. Las realizaciones preferidas incluyen las rutas intravenosa y subcutánea.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral comprenden típicamente el ingrediente activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Dichas formulaciones se pueden preparar, envasar o comercializar en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden 40 preparar, envasar o comercializar en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas. Tales formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir, polvo 45 o gránulos) para la reconstitución con un vehículo adecuado (p.ej., agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponadores (preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para utilizar junto con un vehículo adecuado tal como agua 50 estéril libre de pirógenos. Las formas de administración parenteral ilustrativas incluyen soluciones o suspensiones en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas de propilenglicol o dextrosa. Dichas formas de dosificación se pueden tamponar adecuadamente, si se desea. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, o en una preparación liposómica. Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para que sean de liberación 55 inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Por ejemplo, en un aspecto, las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo o la composición de anticuerpo anti-PD-1 en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, 60 seguido de esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los

enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

5 La fluides apropiada de una solución puede mantenerse, p.ej., mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina, y/o mediante el uso de recubrimientos de liberación modificada (p.ej. recubrimientos de liberación lenta).

10 Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o mediante inhalación, típicamente en forma de un polvo seco (solo, como una mezcla, o como una partícula de componentes mixtos, por ejemplo, mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado) desde un inhalador de polvo seco, como un aerosol desde un recipiente, bomba, pulverizador, atomizador presurizados (preferiblemente un atomizador que usa electrohidrodinámica para producir una neblina fina) o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado, o como gotas nasales.

15 15 El recipiente, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador presurizados generalmente contienen una solución o suspensión de un anticuerpo de la invención que comprende, p.ej., un agente adecuado para dispersar, solubilizar o prolongar la liberación del agente activo, uno o varios propelentes como disolvente.

20 Antes del uso en una formulación de polvo seco o suspensión, el producto farmacéutico generalmente se microniza a un tamaño adecuado para la administración mediante inhalación (típicamente menos de 5 micrómetros). Esto se puede lograr mediante cualquier método de trituración apropiado, tal como molienda por chorro en espiral, molienda por chorro de lecho fluido, procesamiento de fluido supercrítico para formar nanopartículas, homogeneización a alta presión o secado por pulverización.

Las cápsulas, ampollas y cartuchos para utilizar en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base en polvo adecuada y un modificador del rendimiento.

25 25 Una formulación en solución adecuada para uso en un atomizador que utiliza electrohidrodinámica para producir una neblina fina puede contener una dosis adecuada del anticuerpo de la invención por accionamiento y el volumen de accionamiento puede variar, p.ej., de 1 µl a 100 µl.

Se pueden añadir aromas adecuados, tales como mentol y levomentol, o edulcorantes, tales como sacarina o sacarina sódica, a aquellas formulaciones de la invención destinadas a administración inhalada/intranasal.

30 30 Las formulaciones para administración inhalada/intranasal se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

35 35 En el caso de inhaladores de polvo seco y aerosoles, la unidad de dosificación se determina por medio de una válvula que suministra una cantidad medida. Las unidades de acuerdo con la invención están dispuestas típicamente para administrar una dosis medida o "inhalación" de un anticuerpo de la invención. La dosis diaria global típicamente se administrará en una sola dosis o, más habitualmente, como dosis divididas a lo largo del día.

40 40 Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención también pueden formularse para una administración por vía oral. La administración oral puede implicar la deglución, de modo que el compuesto ingrese al tracto gastrointestinal y/o administración bucal, lingual o sublingual por medio de la cual el compuesto ingresa a la corriente sanguínea directamente desde la boca.

Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen sistemas sólidos, semisólidos y líquidos tales como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen productos multi- o nanoparticulados, líquidos o polvos; pastillas (incluidas las rellenas de líquido); chicles; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvalos; aerosoles; y parches bucales/mucoadhesivos.

45 45 Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Dichas formulaciones pueden emplearse como cargas en cápsulas blandas o duras (elaboradas, por ejemplo, de gelatina o hidroxipropilmelcelulosa) y típicamente comprenden un vehículo, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también se pueden preparar mediante la reconstitución de un sólido, por ejemplo, a partir de una bolsita.

Usos terapéuticos de anticuerpos y composiciones de la invención

En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-1 y sus porciones de unión a antígeno, las composiciones anti-PD-1 y las moléculas de unión biespecíficas de la invención se utilizan para potenciar o activar el sistema inmunitario en un ser humano que lo necesite. En algunas realizaciones, el paciente tiene una afección caracterizada por expresión en exceso o hiperactividad de PD-1. En algunas realizaciones, el paciente está inmunosuprimido. En ciertas realizaciones,

el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, composición o composición farmacéutica de molécula de unión biespecífica es para su uso en el tratamiento del cáncer, p.ej., cánceres que se originan en tejidos tales como piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas, y cánceres u otras afecciones que dependen de la actividad de PD-1 o en

- 5 las que el paciente expresa o expresa en exceso PD-L1, PD-L2 o ambos. Los cánceres tratados por los anticuerpos anti-PD-1, sus porciones de unión a antígeno, las composiciones de anticuerpo anti-PD-1, y/o las moléculas de unión biespecíficas de la invención pueden incluir, por ejemplo, melanoma (tal como melanoma avanzado o no resecable o melanoma metastásico), cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, linfoma de Hodgkin y carcinoma de células renales (RCC).

En algunas realizaciones, los cánceres tratados mediante los anticuerpos anti-PD-1, porciones de unión a antígeno, composiciones anti-PD-1 y/o moléculas de unión biespecíficas de la invención pueden incluir, por ejemplo, melanoma (p.ej. melanoma avanzado o metastásico), cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, glioblastoma, glioma, 15 cáncer de pulmón de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario superior, cáncer de esófago, cáncer de la unión gastroesofágica, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de colon, carcinoma colorrectal, mieloma múltiple, sarcomas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico, cáncer nasofaríngeo, leucemia linfoídica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma linfoídico pequeño, cáncer de ovario, cáncer gastrointestinal, cáncer peritoneal primario, 20 cáncer de trompas de Falopio, cáncer urotelial, leucemia/linfoma de células T asociado a HTLV, cáncer de próstata, cáncer genitourinario, meningioma, cáncer de la corteza suprarrenal, gliosarcoma, fibrosarcoma, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de células basales de la piel, cáncer del apéndice, cáncer del tracto biliar, cáncer de la glándula salival, cáncer avanzado de células de Merkel, linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, mesotelioma y tumores sólidos.

- 25 "Tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o anular un trastorno biológico y/o al menos uno de sus síntomas concomitantes. Según se utiliza en la presente memoria, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o la frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Además, las referencias en la presente memoria a "tratamiento" incluyen referencias a tratamientos curativos, paliativos y profilácticos.

- 30 "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de agente terapéutico que se administra que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas del trastorno que se está tratando. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico anticanceroso puede dar como resultado una reducción del tumor, una mayor supervivencia, la eliminación de células cancerosas, la disminución de la progresión de la enfermedad, la reversión de metástasis u otros parámetros clínicos deseados por los profesionales de la salud.

- 35 Las composiciones de anticuerpos o anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden administrar solas o combinadas con uno o más de otros fármacos o anticuerpos (o como cualquier combinación de los mismos). Las composiciones farmacéuticas, métodos y usos de la invención también abarcan por tanto realizaciones de combinaciones (administración conjunta) con otros agentes activos, como se detalla a continuación.

- 40 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que los términos "administración conjunta", "administrado conjuntamente" y "combinado con", que se refieren a las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención con uno o más agentes terapéuticos diferentes, significa que, y se refieran e incluyan lo siguiente:

- 45 - administración simultánea de dicha combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales componentes se formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,

- 50 - administración sustancialmente simultánea de tal combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales componentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que son tomadas prácticamente al mismo tiempo por dicho paciente, tras lo cual dichos componentes se liberan sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,

- 55 - administración secuencial de tal combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales componentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que son tomados en tiempos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, después de lo cual dichos componentes se liberan en tiempos sustancialmente diferentes en dicho paciente; y

- administración secuencial de tal combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno

de la invención y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes de una forma controlada, después de lo cual se liberan de manera simultánea, consecutiva y/o superpuesta en el mismo y/o diferentes momentos a dicho paciente,

- 5 donde cada parte puede ser administrada por la misma ruta o por una diferente.

Las composiciones de anticuerpo y anticuerpos y sus porciones de unión a antígeno de la invención se pueden administrar sin tratamientos terapéuticos adicionales, es decir, como una terapia independiente. Alternativamente, el tratamiento con las composiciones de anticuerpo y anticuerpos y sus porciones de unión a antígeno de la invención puede incluir al menos un tratamiento terapéutico adicional (terapia combinada). En algunas realizaciones, la 10 composición de anticuerpo o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se pueden administrar o formular conjuntamente con otra medicación/fármaco para el tratamiento del cáncer. El tratamiento terapéutico adicional puede comprender, p.ej., un agente quimioterapéutico, antineoplásico o antiangiogénico, un anticuerpo anticanceroso diferente y/o radioterapia.

15 Mediante la combinación de las composiciones de anticuerpo, anticuerpos o porciones de unión a antígeno de la invención con agentes que se sabe que inducen la diferenciación terminal de células cancerosas, el efecto puede mejorarse adicionalmente. Tales compuestos pueden, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en ácido retinoico, ácidos trans-retinoicos, ácidos cis-retinoicos, fenilbutirato, factor de crecimiento nervioso, dimetilsulfóxido, forma activa de vitamina D3, receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol, hexametilen-bis-acetamida, factor de crecimiento transformante-beta, ácido butírico, AMP cíclico 20 y vesnarinona. En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en ácido retinoico, fenilbutirato, ácido todo-trans-retinoico y forma activa de vitamina D.

25 Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo de la invención y al menos otro agente (p.ej., un agente quimioterapéutico, antineoplásico o antiangiogénico) se puede utilizar como un tratamiento combinado para la administración simultánea, separada o sucesiva en la terapia contra el cáncer. El otro agente puede ser cualquier agente adecuado para el tratamiento del cáncer concreto en cuestión, por ejemplo, un agente seleccionado del grupo que consiste en agentes alquilantes, por ejemplo, derivados de platino tales como cisplatino, carboplatino y/u oxaliplatino; alcaloides de plantas, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y/o irinotecán; antibióticos antitumorales, por ejemplo, doxorubicina (adriamicina), 30 daunorubicina, epirubicina, idarrubicina mitoxantrona, dactinomicina, bleomicina, actinomicina, luteomicina y/o mitomicina; inhibidores de topoisomerasa tales como topotecán; y/o antimetabolitos, por ejemplo, fluorouracilo y/u otras fluoropirimidinas.

35 Un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo o composición de anticuerpo anti-PD-1 de la invención también se pueden utilizar combinados con otras terapias contra el cáncer tales como vacunas, citoquinas, inhibidores de enzimas y terapias con células T. En el caso de una vacuna, ésta puede ser, p.ej., una vacuna de proteína, péptido o ADN que contiene uno o más抗原s que son relevantes para el cáncer que se está tratando, o una vacuna que comprende células dendríticas junto con un antígeno. Las citoquinas adecuadas incluyen, por ejemplo, IL-2, IFN-gamma y GM-CSF. Un ejemplo de un tipo de inhibidor de enzima que tiene actividad anticancerosa es un inhibidor de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), por ejemplo 1-metil-D-triptófano (1-D-MT). La terapia con células T adoptiva se refiere a diversas técnicas de inmunoterapia que implican la expansión o modificación genética de las 40 células T de los propios pacientes para reconocer y atacar sus tumores.

45 También se contempla que un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo o una composición de anticuerpo anti-PD-1 de la invención se pueden utilizar en tratamiento coadyuvante en relación con inhibidores de tirosina quinasa. Estos son moléculas sintéticas, principalmente derivadas de quinazolina, de bajo peso molecular que interactúan con el dominio de receptores de tirosina quinasa intracelular e inhiben la fosforilación del receptor inducida por ligando al competir por el sitio de unión de Mg-ATP intracelular.

En algunas realizaciones, la composición de anticuerpo o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se 50 pueden utilizar combinados con otro medicamento/fármaco que media la activación del sistema inmunitario, que incluye, pero no se limita a, un agente que media la expresión o actividad de A2AR, BLTA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD40, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (p.ej., 55 CEACAM-1 y/o CEACAM-5), GAL9, GITR, HVEM, ICOS, IDO, KIR, LAIR1, LAG-3, OX40, TIGIT, TIM-3, TGFR-beta, VISTA y/o 2B4. En ciertas realizaciones, el agente es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se unen a una de las moléculas anteriores. En ciertas realizaciones, la composición de anticuerpo o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención se pueden administrar combinados con un inhibidor de CTLA-4 (p.ej., un anticuerpo anti-CTLA-4 tal como tremelimumab o ipilimumab). En una realización, la composición de anticuerpo o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención se pueden administrar combinados con ipilimumab.

En ciertos aspectos, los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de la invención se pueden administrar combinados con otro inhibidor de la ruta de PD-1, que puede dirigirse a PD-1 o a uno o más de sus ligandos. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen otros anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-PD-L2.

En algunas realizaciones, una composición de anticuerpo, anticuerpo y/o porción de unión a antígeno de la invención se pueden administrar combinados con pembrolizumab y/o nivolumab.

Se entiende que las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden utilizar en un método de tratamiento como se describe en la presente memoria, pueden utilizarse en un tratamiento como se describe en la presente memoria, y/o pueden ser para su uso en la fabricación de un medicamento para un tratamiento como se describe en la presente memoria.

Dosis y ruta de administración

Las composiciones de anticuerpos de la invención se administrarán en una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección en cuestión, es decir, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios para lograr un resultado deseado.

Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como la afección concreta que se vaya a tratar, la edad, el sexo y el peso del paciente, y si los anticuerpos se administran como un tratamiento independiente o combinados con uno o más tratamientos contra el cáncer adicionales.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en formas de dosificación unitarias por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria, como se emplea en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes/sujetos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Los requisitos para las formas de dosificación unitaria de la invención están dictados generalmente por, y son directamente dependientes de, (a) las características únicas del agente quimioterapéutico concreto o el efecto profiláctico que se deba lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Por lo tanto, el experto en la técnica apreciaría, en base a la descripción proporcionada en la presente memoria, que la dosis y el régimen de dosificación se ajustan de acuerdo con métodos bien conocidos en las técnicas terapéuticas. Es decir, la dosis máxima tolerable se puede establecer fácilmente, y también se puede determinar la cantidad eficaz que proporciona un beneficio terapéutico detectable para un paciente, al igual que los requisitos temporales para administrar cada agente para proporcionar un beneficio terapéutico detectable para el paciente. Por consiguiente, aunque en la presente memoria se ilustran ciertas dosis y regímenes de administración, estos ejemplos de ninguna manera limitan la dosis y el régimen de administración que se pueden proporcionar a un paciente en la práctica de la presente invención.

Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se vaya a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Se debe entender adicionalmente que, para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y los intervalos de dosificación establecidos en la presente memoria descriptiva son solo ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición incorporada. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de esta invención puede basarse en una variedad de factores, que incluyen el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, el estado médico del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración, y el anticuerpo concreto empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero puede determinarse de forma rutinaria utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, las dosis pueden ajustarse en función de los parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o valores de laboratorio. Por tanto, se contempla el aumento o disminución progresivos de las dosis intrapaciente según determine el experto en la técnica. La determinación de las dosificaciones y regímenes apropiados es bien conocida en la técnica relevante.

Se contempla que una dosis adecuada de una composición de anticuerpo de la invención estará en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,5 a 50 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 20 mg/kg. La composición de anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, a una dosificación de al menos 0,25 mg/kg, por ejemplo, al menos 0,5 mg/kg, tal como al menos 1 mg/kg, p.ej., al menos 1,5 mg/kg, tal como al menos 2 mg/kg, p.ej., al menos 3 mg/kg, tal como al menos 4 mg/kg, p.ej., al menos 5 mg/kg; y, p.ej., hasta 50 mg/kg como máximo, tal como hasta 30 mg/kg como máximo, p.ej., hasta 20 mg/kg como máximo, tal como hasta 15 mg/kg como máximo. La administración normalmente se repetirá a intervalos adecuados, por ejemplo, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas, y durante el tiempo que el médico responsable considere apropiado, que puede aumentar o disminuir opcionalmente la dosificación cuando sea necesario.

Se puede medir una cantidad eficaz para la terapia tumoral por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas en un paciente, y preferiblemente para invertir la progresión de la enfermedad, p.ej., reduciendo el tamaño del tumor. La capacidad de un anticuerpo o la composición de la invención para inhibir el cáncer se puede evaluar mediante análisis in vitro, p.ej., como se describe en los ejemplos, así como en modelos

animales adecuados que son predictivos de la eficacia en tumores humanos. Se seleccionarán regímenes de dosificación adecuados para proporcionar una respuesta terapéutica óptima en cada situación concreta, por ejemplo, administrados como un solo bolo o como una infusión continua, y con el posible ajuste de la dosificación según lo indicado por las exigencias de cada caso.

5 *Usos y composiciones de diagnóstico*

Los anticuerpos de la presente invención también son útiles en procesos de diagnóstico (p.ej., *in vitro*, *ex vivo*). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden utilizar para detectar y/o medir el nivel de PD-1 en una muestra de un paciente (p.ej., una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal tal como un exudado inflamatorio, sangre, suero, fluido intestinal, saliva u orina). Los métodos de detección y medición adecuados incluyen métodos inmunológicos tales como citometría de flujo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos de quimioluminiscencia, radioinmunoensayo e inmunohistología. También se divultan en la presente memoria kits (p.ej., kits de diagnóstico) que comprenden los anticuerpos descritos en la presente memoria.

10 A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrá los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. Los métodos y materiales ilustrativos se describen a continuación. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

15 Generalmente, la nomenclatura utilizada en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química orgánica sintética, química medicinal y farmacéutica, y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente memoria son las bien conocidas y 20 comúnmente utilizadas en la técnica. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria.

25 Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. A lo largo de esta memoria descriptiva y realizaciones, se entenderá que las palabras "tiene" y "comprende" o variaciones tales como "tiene", "que tiene", "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Aunque se citan varios documentos en la presente memoria, esta mención no constituye una admisión de que ninguno de estos documentos forma parte del conocimiento general común de la técnica.

30 Para que la presente invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de anticuerpos anti-PD-1 a partir de células B de pollo

35 La clonación de genes de anticuerpos derivados de pollo a partir de células B secretoras de anticuerpos (ASC) se realizó por medio de la tecnología de descubrimiento de anticuerpos Symplex™. Brevemente, se aislaron ASC de órganos linfoideos de pollos que se habían inmunizado con antígeno PD-1, como antígeno proteico soluble y/o en su forma nativa unida a membrana celular presentada en células eucariotas. La tinción de las ASC con anticuerpos marcados con fluorescencia permitió la discriminación de las ASC de otras células (p.ej., células T, células B no sometidas a tratamiento previo, monocitos, etc.) antes de la clasificación en los recipientes de PCR. La clasificación individual de ASC se realizó mediante citometría de flujo. Posteriormente, se llevó a cabo el procedimiento Symplex™ 40 para generar productos de PCR que contenían pares V_H y V_L para cada célula B ordenados como se describe más adelante.

45 La conexión de secuencias codificantes de V_H y V_L se realizó en las ASC clasificadas, facilitando el emparejamiento cognado de las secuencias. El proceso utilizó un procedimiento de PCR de dos etapas basado en RT-PCR de solapamiento-extensión múltiple de dos etapas seguido de PCR anidada. El principio para el enlace de secuencias de V_H y V_L cognadas utilizando la tecnología Symplex™ se describe en detalle en los documentos WO 2005/042774; WO 2008/104184; WO 2010/022738, y Meijer et al., *J Mol Biol* **358(3)**:764-72 (2006). Brevemente, los fragmentos V_H y V_L cognados amplificados se unen mediante PCR solapamiento-extensión en una etapa denominada de PCR anidada. En el procedimiento posterior, los productos de PCR se agrupan antes de la clonación en un vector plasmídico. Esto se hace de tal manera que los fragmentos de ADN clonados que codifican los dominios variables del anticuerpo de pollo puedan expresarse como un anticuerpo químérico completo a partir de una única construcción de expresión de plásmido en células de mamífero transfectadas. Consecuentemente, es posible escrutar los sobrenadantes celulares para determinar los anticuerpos químéricos que muestran unión específica al antígeno PD-1.

Materiales y métodos

50 La tecnología Symplex™ como se describe en las publicaciones mencionadas anteriormente se modificó para amplificar V_L y V_H de células B de pollo clasificadas. La clonación de una construcción de expresión funcional se realizó

en dos etapas, tal como se describe a continuación.

Etapa 1. Los productos de PCR amplificados que contienen los fragmentos V_H y V_L emparejados se amplificaron en una reacción de PCR anidada. Esto permitió la adición de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción flanqueantes para Apal y AvrII en cada extremo. Dado que las secuencias de V_H y V_L cognadas fueron emparejadas en un único producto de PCR de cada ASC clasificada, la clonación de los productos de PCR se realizó después de agrupar todos los fragmentos de PCR. El plásmido pML392 se construyó para recibir los productos de PCR Symplex™ por digestión de los sitios de restricción correspondientes Apal y AvrII. La ligación resultante de productos de PCR agrupados y pML392 se muestra en la Figura 1. Aquí la inserción del producto de PCR colocó las secuencias de V_H y V_L frente a CH1-CH2-CH3 humanas y regiones de ADNc constante lambda, respectivamente, de modo que se obtuvieron los marcos de lectura de cadena pesada y ligera completas.

Etapa 2. En las construcciones iniciales, los dos marcos de lectura que codifican las secuencias de cadena pesada y ligera se colocaron cabeza a cabeza y separados por una secuencia de ADN que contenía sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para Ascl y Nhel. Mediante la inserción de un fragmento de ADN del promotor de CMV doble digerido con Ascl/Nhel correspondiente que incluía las UTR 5' y péptidos señal entre los dos extremos 5' de los genes de cadena pesada y ligera, se obtuvo una construcción de expresión completa como se representa en la Figura 2.

Ejemplo 2: Clonación de análogos de anticuerpos de referencia anti-PD-1

Este ejemplo explica brevemente cómo se generaron los análogos de referencia de los anticuerpos anti-PD-1 nivolumab y pembrolizumab.

Las secuencias de aminoácidos que codifican los dominios de cadena pesada y ligera variables de los análogos de anticuerpos de nivolumab y pembrolizumab se obtuvieron del sitio web de IMGT® imgt.org/mAb-DB/; véase la Tabla 3 a continuación. Las secuencias de proteína se tradujeron de forma inversa a secuencias de ADN con uso de codones humanos. Las secuencias de ADN correspondientes se sintetizaron a continuación y se clonaron en vectores de expresión que contienen dominios constantes de cadena pesada o de cadena ligera kappa de IgG₄ humana, dando como resultado la expresión de anticuerpos completos. Para evitar el intercambio de brazo Fab, el resto de serina en la posición 228 se sustituyó por prolina (Angal et al., *Mol. Immunol.*, 30:105-108 (1993)). Las células CHO se transfecaron con los plásmidos de expresión correspondientes utilizando un sistema de expresión de proteínas convencional. Los sobrenadantes de anticuerpo correspondientes se purificaron utilizando cromatografía en columna de purificación de proteína A convencional.

Tabla 3 Análogos de anticuerpos sintetizados genéticamente

Anticuerpo	Código	Formato de anticuerpo	Página web de Referencia
Pembrolizumab/KEYTRUDA®	MK-3475	IgG ₄ recombinante, S228P	imgt.org/mAb-DB/mAbcard?AbId=472
Nivolumab/OPDIVO®	BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538	IgG ₄ recombinante, S228P	imgt.org/mAb-DB/mAbcard?AbId=424

Ejemplo 3: Escrutinio de repertorios de anticuerpos para su unión a PD-1 expresada en la superficie celular

Los anticuerpos clonados del repertorio anti-PD-1 se transfecaron individualmente y se expresaron en células HEK293 utilizando el Reactivo de transfección 293fectin™ (Invitrogen, Núm. Cat. 12347-019) en formato de 384 pocillos, y se recogieron los sobrenadantes que contenían anticuerpos el día 6 después de la transfección.

Para el escrutinio de anticuerpos basado en células, las células CHO-S se transfecaron en formato de 384 pocillos para expresar PD-1 humana completa utilizando el reactivo Freestyle™ MAX (Invitrogen, Núm. Cat. 16447-100), y las células no transfecadas se utilizaron como control negativo. Para permitir una configuración de escrutinio multiplexado, las células no transfecadas se marcaron utilizando CFSE y se mezclaron con células transfecadas con PD-1 no marcadas a una razón de 1 a 1, y una densidad de 1E6 célula por ml, cada una. En placas de 384 pocillos, se mezclaron 40 µl de esta mezcla celular con 10 µl del sobrenadante que contenía anticuerpo, y el anticuerpo unido a la célula se reveló mediante la adición de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana (H+L) AF647 (Molecular Probes, Núm. Cat. A21445) en una configuración sin lavado. Las muestras se adquirieron utilizando citometría de flujo de alto rendimiento (iQue® Screener, Intellicyt) y los datos se analizaron utilizando soporte lógico ForeCyt® trazando CFSE frente a la unión de IgG humana (AF647). Los éxitos primarios específicos de PD-1 se identificaron como clones de anticuerpos que se unen solo a células transfecadas con PD-1 humana (negativo para CSFE), pero no a células control (positivo para CFSE), y se recogieron números de placa y las coordenadas de placa para la selección de los éxitos y posterior análisis de la secuencia.

Las Figuras 3A-3C muestran gráficos de puntos de citometría de flujo representativos para (A) un clon de anticuerpo que se une específicamente a células transfectadas con PD-1 humana, (B) un clon que no se une específicamente a células CHO-S, y (C) un clon que no se une a ninguna de las poblaciones celulares utilizadas en el escrutinio.

Ejemplo 4: Humanización de anticuerpos anti-PD-1

- 5 La humanización de las regiones marco de los anticuerpos anti-PD-1 de pollo se realizó con el fin de producir moléculas de anticuerpo que tienen inmunogenicidad mínima cuando se administran a seres humanos, a la vez que retienen sustancialmente la especificidad y afinidad de los anticuerpos parentales de pollo.

Materiales y métodos

- 10 La humanización de los anticuerpos derivados de pollo se realizó utilizando el enfoque de "inyerto de CDR", un método originalmente descrito por Jones et al., *Nature* **321**:522-525 (1986). En primer lugar, se utilizó la herramienta BLAST con los dominios pesado variable (V_H) y ligero variable (V_L) de los anticuerpos frente a bases de datos de IgG humanas con el fin de encontrar genes de la línea germinal humana más cercana. Esto identificó los genes humanos IGHV3-23*01 (M99660) e IGLV3-19*01 (X56178) como los más cercanos a los genes V_H y V_L del pollo, respectivamente. Del mismo modo, las secuencias de aminoácidos humanos seleccionados para humanización de la región del gen J se obtuvieron a partir deIGHJ1*01 (J00256) y IGLJ6*01 (M18338) para V_H y V_L , respectivamente. Además, los genes de V_H y V_L del anticuerpo se alinearon frente a los genes de la línea germinal de inmunoglobulina de pollo para identificar mutaciones somáticas en las regiones marco que pueden jugar un papel en la función y/o estructura de los anticuerpos. Dichos restos pueden incluirse en los genes del anticuerpo humanizado finales como los denominados restos de "retromutación". Finalmente, se considera que algunas posiciones de aminoácidos, los denominados "restos de Vernier" (Foote y Winter, *J Mol Biol.* **224**(2):487-99 (1992)), que se sabe que juegan un papel importante en la estructura, estabilidad y función de los anticuerpos, generan variantes de anticuerpos humanizados alternativos que incluyen restos humanos o de pollo de las líneas germinales correspondientes.

- 25 Las secuencias de CDR de la presente memoria se determinaron de acuerdo con las definiciones de IMGT® para CDR1 y CDR2. Para CDR3 de la cadena pesada y ligera, las definiciones en la presente memoria incluyen un resto adicional de aminoácidos aguas arriba de IMGT-CDR3 (Cys) y un resto de aminoácido adicional aguas abajo (Trp para CDR3 de V_H , Phe para CDR3 de V_L).

- 30 El ensamblaje de la CDR de pollo y de las regiones marco humanas se realizó mediante PCR de extensión del solapamiento. Los productos de PCR de V_H and V_L humanizados resultantes se clonaron en vectores de expresión (plásmidos) que albergan regiones constantes de cadena pesada y ligera humana. Para aumentar la escisión correcta del péptido señal aguas arriba de la cadena lambda, el segundo aminoácido (Ser) del gen lambda IGLV3.19 se reemplazó por otro aminoácido (Tyr) que está presente en otras líneas germinales humanas, por ejemplo, IGLV3.25. La secuencia de la cadena pesada contiene las dos mutaciones "LALA" (L234A/L235A) conocidas por reducir la función efectora de la región Fc de los anticuerpos IgG1 (Armour et al., *Eur J Immunol.* **29**(8):2613-24 (1999); y Armour et al., *Mol Immunol.* **40**(9):585-93 (2003)). El vector de expresión también contenía las secuencias reguladoras necesarias, permitiendo la expresión simultánea de cadenas ligeras y pesadas que se ensamblan para proporcionar anticuerpos completos después de la transfección de células de mamífero.

Resultados

- 40 Las secuencias de anticuerpos humanizados finales se muestran a continuación en la Tabla 4, y las secuencias de CDR se muestran por separado en las secuencias de la Tabla 5. Las secuencias CDR se definen en las Tablas de acuerdo con el esquema de numeración IMGT®.

Tabla 4 Secuencias V_H y V_L de anticuerpos anti-PD-1 humanizados*

Anticuerpo humanizado	Secuencia de aminoácidos de V_H	Secuencia de aminoácidos de V_L
[12819.15384]	EVQLESGGGLVQP PGSSLRLSCAASGFTFTRDYD MWVRQ APGKGLEWVAG/ <u>GDSNKW</u> TRYAPAVKGRATISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYY <u>CAKGSCIACWDEAGRIDAWGQGT</u> LVTSS (SEQ ID NO: 2)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>GSYDGS</u> SSYGWYQQKPGQA PVTVIYN <u>NNNNRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYY<u>CG</u> <u>SYDRPETNSD</u>YGM/<u>FGSGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 3)</u>
[12748.15381]	EVQLESGGGLVQP PGSSLRLSCAASGFTFSDYAMN WVRQ APGKGLEWVAG/ <u>GNDGSYTN</u> YGAAVKGRATISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYY <u>CASDIRSRNDCSYFLGGC</u> SSGF <u>DV</u> <u>WGQGTLVTSS</u> (SEQ ID NO: 4)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>GSYDGS</u> SSYGWYQQKPGQAPVTVI YES <u>SNRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYY<u>CGNADS</u> <u>SSGIFGSGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 5)</u>
[12865.15377]	EVQLESGGGLVQP PGSSLRLSCAASGFD FSD <u>DHGM</u> MQWVRQ APGKGLEYGVV/ <u>DTTGR</u> TYYAPAVKGRATISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYY <u>CAKTTCVGYLCNTVGSIDA</u> W <u>GQG</u> TLVTSS (SEQ ID NO: 6)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>GSYDGS</u> SSYGWYQQKPGQAPVTVI VIY <u>DDTNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYY<u>CGGYE</u> <u>GSSHAGIFGSGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 7)</u>
[12892.15378]	EVQLESGGGLVQP PGSSLRLSCAASGFD FSSYTM MQWVRQ APGKGLEWVGV/ <u>ISSTGG</u> STGYGP AVKGRATISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYY <u>CVKSISGD</u> AWSVD <u>GLD</u> AWGQGT LVTSS (SEQ ID NO: 8)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>GSAY</u> GWYQQKPGQAPVTVIY Y <u>MNQRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYY<u>CGSYDSS</u> <u>AVGIFGSGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 9)</u>

Anticuerpo humanizado	Secuencia de aminoácidos de V _H	Secuencia de aminoácidos de V _L
[12796.15376]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFDSSYTM</u> MQWVRQ APGKGLEWVGVI <u>SSTG</u> STGYGP AV KGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CVKSVSGDAWSVDGLDAWGQGT</u> LVTSS (SEQ ID NO: 10)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>GSAYGWYQQKPGQQAPVTVIY</u> <u>YNNM</u> QRPSPDIPDRFSGSSSSGNTASLTITGAQAEDADYY <u>CGSYDSS</u> <u>AVGIFGSGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 11)
[12777.15382]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFDSSYGM</u> MQWVRQ APGKGLEWVGVI <u>SGSG</u> ITLYPAVAKGRATISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CTRSPSITDGWTYGGAWIDAWGQGT</u> LVTSS (SEQ ID NO: 12)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>DGSYGW</u> FQQKPGQQAP <u>DNDN</u> RPSDIPDRFSGSSSSGNTASLTITGAQAEDADYY <u>CGNADLS</u> <u>GIFGSGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 13)
[12760.15375]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSTFM</u> MVVWVRQAPGKGLEYVAE <u>ISDG</u> GSFTWYATAVKGRATISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CAKSDCSSSYGYSCIIDAWGQGT</u> LVTSS (SEQ ID NO: 14)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>SDDGSYYY</u> GWFFQQKPGQQAP <u>VTVIYIN</u> DRRPSNIPDRFSGSSSSGNTASLTITGAQAEDADYY <u>CGSY</u> <u>DSSAGVGIFGSGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 15)
[13112.15380]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSYMMFWV</u> RQ APGKGLEFVAE <u>ISGSNTGSRT</u> WYAPAVKGRATISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CAKSIYGGYSCGVGLIDA</u> <u>WGQGTLVTVSS</u> (SEQ ID NO: 16)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>SSDYY</u> GWFFQQKPGQQAPVTVIY <u>NNM</u> KRPSPDIPDRFSGSSSSGNTASLTITGAQAEDADYY <u>CGNADLS</u> <u>SVGIFGSGTKVTVL</u> (SEQ ID NO: 17)

* Las regiones CDR están en cursiva, subrayadas y en negrita.

Tabla 5 Secuencias de H- y L-CDR de anticuerpos anti-PD-1 humanizados

Anticuerpo humanizado	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
[12819.15384]	GFTFTRYD	IGDSNKMT	CAKGSCIACWDEAGRIDAW	GSYDGSSY	NNNN	CGSYDRPETNSDYYGMF
SEQ ID NO:	18	19	20	21	22	23
[12748.15381]	GFTFSDYA	IGNDGSYT	CASDIRSRNDCSYFLGGCSSGFIDWW	SSYS	ESN	CGNADSSSGIF
SEQ ID NO:	24	25	26	27	28	29
[12865.15377]	GFDSDHCG	IDTTGRYT	CAKTTTCVGGYLCNTVGSIDAW	GSSSY	DDT	CGGYEGSSHAGIF
SEQ ID NO:	30	31	32	33	34	35
[12892.15378]	GFDSSYT	ISSTGGST	CVKSISGDAWSVDGLDAW	GSA	YNN	CGSYDSSAVGIF
SEQ ID NO:	36	37	38	39	40	41
[12796.15376]	GFDSSYT	ISSTGGST	CVKSISGDAWSVDGLDAW	GSA	YNN	CGSYDSSAVGIF
SEQ ID NO:	42	43	44	45	46	47
[12777.15382]	GFDSSYGY	ISGSGITT	CTRSPSITDGWTYGGAWIDAW	DGS	DND	CGNAIDLSSGGIF
SEQ ID NO:	48	49	50	51	52	53
[12760.15375]	GFTFSTFN	ISSDGSTT	CAKSDCSSSSYYGYSCTGIDAW	ISDDGSSYY	IND	CGSYDSSAGVGIF
SEQ ID NO:	54	55	56	57	58	59
[13112.15380]	GFTFSSYN	ISGSNTGSRT	CAKSIYGGYCAGGYSCKVGLIDAW	SSDY	YNN	CGNADSSVGIF
SEQ ID NO:	60	61	62	63	64	65

Todos los anticuerpos humanizados comprendían la región constante de la cadena pesada variante de IgG1 "LALA" y las secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera que se muestran a continuación.

Región constante de cadena pesada (SEQ ID NO: 67):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 5 TQTYICNVNKHPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVQV
 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

Región constante de cadena ligera (SEQ ID NO: 68):

10 GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPE
 QWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Ejemplo 5: Escrutinio de candidatos de anticuerpos anti-PD-1

PD-1 se expresa principalmente en la superficie de los linfocitos T activados, donde regula negativamente la actividad de las células T. Para seleccionar los candidatos de anticuerpos anti-PD-1 más funcionales, se establecieron dos sistemas de escrutinio *in vitro* diferentes, un análisis en sangre completa de Enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) y un ensayo de reacción mixta linfocitaria unidireccional.

Materiales y métodos

20 Se escrutó inicialmente un repertorio de 69 mAb humanizados únicos en el formato de armazón IgG1-LALA, es decir, teniendo las mutaciones "LALA" descritas en el Ejemplo 4, y se clonaron y humanizaron como se describió anteriormente, para determinar la actividad funcional en el análisis en sangre completa de SEB. SEB es un superantígeno que se une a las moléculas del MHC de clase II y regiones específicas de V β de los receptores de células T (TCR) y dirige la estimulación no específica de las células T. Esto da como resultado la activación/proliferación de células T policlonales y la liberación de citoquinas incluyendo IL-2 e IFN- γ .

25 Con el fin de investigar la relevancia del análisis de SEB para el escrutinio de la actividad anti-PD-1, se investigó el nivel de expresión de PD-1 para diferentes donantes antes y después de la estimulación con SEB. Las PBMC de seis donantes diferentes se sometieron a ensayo para determinar la expresión de PD-1 mediante citometría de flujo el día 0 y el día 3 después de la estimulación con SEB. Se estableció una salida de linfocitos relevante para un análisis posterior.

30 Basándose en el escrutinio en los análisis en sangre completa de SEB, utilizando sangre de al menos tres donantes diferentes, se identificaron los 10 principales candidatos de anticuerpo anti-PD-1. Los candidatos de anticuerpo anti-PD-1 se titularon posteriormente para obtener curvas de dosis-respuesta para cada anticuerpo individual en comparación con los controles positivos, análogos de referencia de los anticuerpos anti-PD-1 pembrolizumab (Merck) y nivolumab (Bristol-Myers Squibb); véase el Ejemplo 2.

35 La funcionalidad de los 10 principales anticuerpos anti-PD-1 seleccionados se validó en un análisis *in vitro* alternativo, el ensayo de reacción mixta linfocitaria unidireccional (MLR). En este ensayo, las células dendríticas (DC) de un donante se cultivaron conjuntamente con células T CD4 $^{+}$ de otro donante para obtener estimulación específica de aloantígeno, inducida en 10-15% de todas las células T, lo que condujo a la activación/proliferación de células T y secreción de citoquinas.

40 Debido a un problema de estabilidad de la proteína para uno de los candidatos (12748.15381), se utilizaron secuencias alternativas de la línea germinal para este anticuerpo específico. Uno de los anticuerpos resultantes, 12748.16124, se menciona a continuación. Esta variante tiene una secuencia V $_L$ diferente, pero la misma secuencia V $_H$ como 12748.15381 (Tabla 1, más arriba).

Resultados

45 Los datos en la Figura 4 muestran claramente que la frecuencia de linfocitos que expresan PD-1 aumenta en todos los donantes sometidos a ensayo después de la estimulación con SEB. Estas observaciones confirman la relevancia de este análisis para el escrutinio de anticuerpos anti-PD-1.

50 La titulación de los anticuerpos anti-PD-1 más funcionales en el análisis de SEB, mostrada en las Figuras 5A-I, identificó los mejores candidatos anti-PD-1 con funcionalidad similar o superior a los análogos de anticuerpo de control positivo pembrolizumab y nivolumab. En este análisis, se estimuló sangre completa con SEB durante 48 h en presencia de los anticuerpos indicados, y se midió la secreción de IL-2 después de 48 horas mediante ELISA. Cada punto de

datos representa un promedio de seis réplicas, indicando las barras el ETM.

Las Figuras 5A-H muestran los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-PD-1 humanizados. Debido a la agregación por encima de 5% para uno de los anticuerpos [12748.15381], se sometió a ensayo un marco alternativo para este anticuerpo. Los datos en la Figura 5I muestran una funcionalidad similar del anticuerpo humanizado original [12748.15381] y su variante de la línea germinal (marco) [12748.16124].

La funcionalidad de los anticuerpos anti-PD-1 se validó en un ensayo MLR unidireccional. En este ensayo, las células dendríticas y las células T CD4⁺(proporción 1:10) de dos donantes diferentes se cultivaron conjuntamente, y se midió la secreción de IFN-γ mediante MesoScale después de 5 días. Cada punto de datos representa un promedio de seis réplicas, indicando las barras indican el ETM. Los datos obtenidos del ensayo MLR unidireccional e ilustrados en las Figuras 6A-H muestran la misma funcionalidad y clasificación de los anticuerpos anti-PD-1 que los datos obtenidos del ensayo con SEB. Esta consistencia en los datos entre diferentes ensayos proporciona una confirmación adicional de que los anticuerpos seleccionados son funcionales.

Los anticuerpos seleccionados se originan a partir de dos diferentes familias ("bins") de epítopos principales, lo que indica que se unen a dos epítopos diferentes que no se solapan. Todos los anticuerpos anti-PD-1 mostrados pertenecen al Bin 1, excepto para los anticuerpos 12760 y 13112, que pertenecen al Bin 2. Se encontró que los anticuerpos anti-PD-1 del Bin 1 muestran la funcionalidad más alta en estos ensayos *in vitro*.

Ejemplo 6: Análisis de citometría de flujo de anticuerpos anti-PD-1 para determinar la actividad bloqueante del ligando PD-L1

Este ejemplo ilustra cómo se sometió a ensayo el panel de anticuerpos anti-PD-1 para determinar la actividad bloqueante del ligando PD-L1 realizando un análisis competitivo mediante citometría de flujo utilizando PD-1 expresado en la superficie celular y PD-L1 soluble marcado con fluorocromo.

Materiales y métodos

La actividad bloqueante del ligando PD-L1 se investigó en análisis celular múltiplex, en el que PD-1 humana y de cinomolgo se expresaron de manera recombinante en células CHO-S y la unión de la proteína quimera PD-L1-Fc humana marcada con R-PE (R-ficoeritrina) se analizó mediante citometría de flujo. La proteína quimera PD-L1-Fc recombinante asequible comercialmente (R&D Systems, USA) se conjugó con R-PE utilizando el Kit de Conjugación con R-Ficoeritrina Lightning-Link® (Innova Biosciences, UK). Las células CHO-S transfectadas transitoriamente para expresar PD-1 humana se mezclaron con las células CHO-S teñidas con CFSE que expresaban transitoriamente PD-1 de cinomolgo. Esta mezcla de células se incubó a continuación con 50 µl de anticuerpo anti-PD-1 a 20 µg/ml sobre hielo, seguido de la adición de 50 µl de PD-L1-Fc marcada con R-PE a aprox. 3,4 µg/ml (concentración final 16,4 nM) y posterior incubación durante 20 min adicionales (concentración final de anticuerpo anti-PD-1: 10 µg/ml). El anticuerpo unido se detectó utilizando anticuerpo anti-cadena ligera de IgG humana conjugado con APC (aloficocianina). La unión de los anticuerpos PD-L1 y anti-PD-1 se cuantificó mediante citometría de flujo detectando fluorescencia R-PE y APC, respectivamente.

Resultados

Los resultados del experimento de competición se presentan en las Figuras 7A-B y se resumen en la Tabla 6 a continuación. Todos los anticuerpos anti-PD-1 se analizaron a una concentración de anticuerpo final de 10 µg/ml (véase más arriba). Tres de los anticuerpos sometidos a ensayo fueron capaces de inhibir la unión de PD-L1 en 83% o más, similar al anticuerpo de referencia anti-PD-1 lambrolizumab (Merck), que es el mismo que pembrolizumab y se incluyó como control positivo. Un anticuerpo (12777.13362) solo inhibió parcialmente la unión en un 69%. Un anticuerpo (13112.13208) no bloqueó la unión de PD-1. La unión de PD-L1 a células que expresan PD-1 en presencia del anticuerpo anti-VEGFR2 de control negativo ramicirumab (Genentech) se ajustó a 0%.

Tabla 6 Inhibición de unión a PD-L1 en presencia de anticuerpos anti-PD-1

Anticuerpo	% de inhibición de la unión de PD-L1
12819.13367	87%
12748.13354	86%
12892.13195	88%
12777.13362	69%
13112.13208	5%

Anticuerpo	% de inhibición de la unión de PD-L1
Lambrolizumab (control pos.)	88%
Ramucirumab (control neg.)	ajustado a 0%

Las variantes humanizadas mostradas en la Tabla 6 tienen las mismas secuencias de aminoácidos que las de la Tabla 1 que comparten los primeros 5 dígitos en sus nombres, excepto que las variantes de la Tabla 1 tienen restos de aminoácidos "SY" en el extremo N-terminal de la cadena ligera. En algunas realizaciones, el dipéptido SY mejora el procesamiento del péptido señal durante la expresión de la cadena ligera del anticuerpo. Se espera que las variantes en las Tablas 1 y 6 tengan propiedades funcionales idénticas.

Ejemplo 7: Medición de las afinidades del anticuerpo PD-1 contra antígeno ECD de PD-1 humana y de cinomolgo

Este ejemplo demuestra que la mayoría de los anticuerpos anti-PD-1 muestran una alta afinidad picomolar (pM) y una buena reactividad cruzada contra los dominios extracelulares (ECD) de PD-1 tanto humanos como de cinomolgos.

Materiales y métodos

El análisis de unión cinética del repertorio de anticuerpo anti-PD-1 purificado se realizó en un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) XPR-36 (Bio-Rad, EE. UU.). Los antígenos contra ECD de PD-1 humanas o de cinomolgos etiquetados con His se adquirieron de Acro Biosystems, Reino Unido. La cinética de unión se midió en condiciones de antígeno monovalente inmovilizando anticuerpos anti-PD-1 y manteniendo el antígeno PD-1 monovalente en solución como se describió previamente (Canziani y col., *Anal Biochem* **325**(2):301-307 (2004)). Se aplicó la densidad de anticuerpos anti-PD-1 más baja posible para evitar la unión inespecífica y la limitación del transporte en masa. Para medir la cinética de anticuerpos, los anticuerpos anti-PD-1 se ajustaron a una concentración de 1,0 µg/ml y se capturaron en superficies con anti-Fc de IgG humana generados por la inmovilización de aproximadamente 1.000 UR de un anticuerpo monoclonal anti-Fc humano (Biacore, Dinamarca). Se sometieron a ensayo anticuerpos anti-PD-1 para determinar la unión a ECD de PD-1 humana o de cinomolgo en un intervalo de concentración 3 veces mayor de 25 nM a 0,31 nM seguido de la regeneración de las superficies con tampón de regeneración MgCl₂ 3 M (Biacore, Dinamarca). Se empleó un caudal elevado de 20 µl/min, un tiempo de asociación de 3,33 min y un tiempo de disociación entre 1,5 horas y 2,75 horas. Las respuestas de unión registradas se ajustaron a un modelo simple de unión de Langmuir 1:1 para el cálculo de las constantes de velocidad de asociación (k_{on} o k_a), velocidad de disociación (k_{off} o k_d) y afinidad (K_D) utilizando doble referencia.

Resultados

Las cinéticas de unión se tabulan en la Tabla 7 a continuación, que ilustra que el panel de anticuerpos anti-PD-1 se une a PD-1 con afinidades muy altas en el intervalo pM. Todos los anticuerpos reconocen PD-1 humana con mayor afinidad que los análogos de nivolumab y pembrolizumab. El anticuerpo de mayor afinidad [12819.15384] se une a PD-1 humana con una K_D de 20 pM.

Tabla 7 Cinética de unión de anticuerpos anti-PD-1 a ECD de PD-1 humana o de cinomolgo medida por Resonancia Plasmón Superficial (SPR)

Anticuerpo	ECD de PD-1	k_{on} (M-1 s-1)	Error k_{on}	k_{off} (s-1)	Error k_{off}	K_D (pM)
[12819.15384]	Humano	1,1E+06	± 1,7E+03	2,3E-05	± 1,3E-07	20
[12819.15384]	Cynomolgus	9,7E+05	± 1,6E+03	4,5E-06	± 1,5E-07	5
[12748.15381]	Humano	3,2E+06	± 1,0E+04	1,7E-04	± 7,1E-07	54
[12748.15381]	Cynomolgus	4,6E+06	± 1,6E+04	4,7E-04	± 9,1E-07	101
[12748.16124]	Humano	3,4E+06	± 8,2E+03	1,6E-04	± 5,9E-07	47
[12748.16124]	Cynomolgus	4,8E+06	± 1,8E+04	3,9E-04	± 9,8E-07	81
[12865.15377]	Humano	4,2E+05	± 2,2E+03	2,3E-04	± 5,5E-07	558
[12865.15377]	Cynomolgus	5,1E+05	± 2,2E+03	3,8E-04	± 7,3E-07	738
[12892.15378]	Humano	4,6E+05	± 2,3E+03	3,4E-04	± 7,1E-07	737

Anticuerpo	ECD de PD-1	k _{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)		Error k _{on}	k _{off} (s ⁻¹)		Error k _{off}	K _D (pM)
[12892.15378]	Cynomolgus	2,9E+05	±	1,0E+10	6,9E-04	±	8,5E-01	2340
[12796.15376]	Humano	7,1E+05	±	3,9E+03	3,8E-04	±	1,1E-06	542
[12796.15376]	Cynomolgus	3,2E+05	±	3,5E+03	7,0E-04	±	2,5E-06	2220
[12777.15382]	Humano	2,4E+05	±	1,7E+03	8,0E-05	±	4,0E-06	337
[12777.15382]	Cynomolgus	2,5E+05	±	7,3E+03	1,7E-04	±	3,5E-06	681
[12760.15375]	Humano	1,2E+06	±	3,4E+03	1,4E-04	±	6,5E-07	112
[12760.15375]	Cynomolgus	1,0E+06	±	1,7E+04	7,2E-03	±	5,8E-05	6940
[13112.15380]	Humano	1,2E+06	±	4,8E+03	6,9E-05	±	7,4E-07	60
[13112.15380]	Cynomolgus	2,5E+06	±	1,5E+04	1,1E-03	±	3,9E-06	452
análogo de nivolumab	Humano	1,4E+06	±	9,2E+03	1,1E-03	±	4,1E-06	758
análogo de nivolumab	Cynomolgus	1,4E+06	±	8,5E+03	7,7E-04	±	2,9E-06	542
análogo de pembrolizumab	Humano	2,4E+06	±	2,7E+04	2,1E-03	±	1,1E-05	852
análogo de pembrolizumab	Cynomolgus	1,7E+06	±	1,0E+04	3,3E-04	±	9,5E-07	190

Ejemplo 8: Establecimiento de familias ("binning") de epítopes de anticuerpos anti-PD-1

Este ejemplo ilustra cómo los anticuerpos PD-1 se agruparon en familias de epítopos basándose en patrones de competición emparejados. Los anticuerpos que pertenecen a diferentes ubicaciones de epítopos reconocen diferentes epítopos en ECD de PD-1.

Métodos

La investigación de la competición de anticuerpos emparejados se realizó mediante análisis de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) utilizando un Microscopio de Flujo Continuo (CFM) (Wasatch Microfluidics, EE.UU.) combinado con un aparato IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, Países Bajos). El análisis de imágenes de resonancia de Plasmón superficial se realizó en sensores E2S SensEye® SPR (Ssens BV, Países Bajos). Se diluyeron un total de diez anticuerpos anti-PD-1 (humanos, IgG1) a 10 pg/ml en tampón de acetato sódico 50 mM, pH 4,5. Los anticuerpos se aplicaron en un E2S SensEye® y se conjugaron durante 15 minutos utilizando un Microspotter de flujo continuo. Después de la aplicación, el SensEye® se colocó en el biosensor IBIS MX96 y se desactivó con etanolamina 1 M, pH 8,5 durante 10 minutos. Después de la preparación del sensor, el análisis de competición de anticuerpos se realizó utilizando un ensayo sándwich clásico. El antígeno de ECD de PD-1 monovalente (Sino Biological, China) se diluyó en tampón de migración HBS-EP y se inyectó a una concentración 50 nM y se capturó mediante la matriz conjugada de anticuerpos anti-PD-1. A continuación, se realizaron inyecciones individuales de cada uno de los diez anticuerpos PD-1 diluidos a 100 nM en tampón de migración HBS-EP para establecer los patrones de competición de anticuerpos. Después de cada ciclo de competición, la superficie del sensor se regeneró con tampón de Glicina HCl 10 mM, pH 2,0.

Resultados

El patrón de competición de diez anticuerpos anti-PD-1 se presenta en la Figura 8. No se encontró que 12866 y 12807 tuvieran actividad funcional en análisis basados en células, pero se incluyeron debido a que reconocen epítopos distintos. Se descubrió que los anticuerpos anti-PD-1 funcionales sometidos a ensayo se unen a dos familias de epítopos que no se solapan. Todos los anticuerpos funcionales pertenecientes al Bin 1 de epítopos se bloquearon de manera cruzada entre sí e incluyeron análogo de nivolumab ("Nivo"), análogo de pembrolizumab ("Pembro"), 12819, 12892, 12865 y 12777. Se descubrió que estos anticuerpos bloquean significativamente la unión de PD-L1 y PD-L2. Se encontró que 12760 y 13112 se unen a un Bin 2 de epítopos separado debido a que se bloquean de manera cruzada uno con otro, pero no bloquean la unión de ninguno de los anticuerpos del Bin 1 de epítopos. Por consiguiente 12760 y 13112 se unen probablemente a un sitio diferente en PD-1 que no se solapa con el sitio de unión al ligando de PD-L1 y PD-L2.

Los anticuerpos funcionales de bloqueo cruzado 12819, 12865, 12892, 12777, nivolumab y pembrolizumab que pertenecen al Bin 1 de epítopos podrían subdividirse adicionalmente en cuatro subfamilias basándose en la competición con 12866 y 12807 (Figura 8). 12819 (Bin 1C) fue el único anticuerpo que bloqueó la unión de 12866 y 12807, mientras que nivolumab (Bin 1D) solo bloqueó 12866 y pembrolizumab (Bin 1F) solo bloqueó 12807. El grupo de anticuerpos pertenecientes al Bin 1E (12865, 12892 y 12777) fue único ya que no bloqueó la unión de 12866 o 12807.

Finalmente, 12866 (Bin 1A) y 12807 (Bin 1B) unieron familias de epítopos únicos. 12866 fue bloqueado por 12819 y nivolumab, pero no por otros anticuerpos anti-PD-1, y 12807 fue bloqueado por 12819 y pembrolizumab, pero no por otros anticuerpos anti-PD-1.

10 Ejemplo 9: Medición de la reactividad cruzada del anticuerpo PD-1 contra el antígeno ECD de PD-1 de ratón y rata

Este ejemplo demuestra que el anticuerpo anti-PD-1 12819.15384 reacciona de manera cruzada fuertemente con PD-1 de ratón, pero no se une a PD-1 de rata.

Materiales y métodos

15 Se adquirieron ECD de PD-1 de ratón y rata etiquetados con His de Sino Biologicals. El análisis de unión cinética se realizó como se describe en el Ejemplo 7.

Resultados

20 Las cinéticas de unión se tabulan en la Tabla 8 a continuación. El anticuerpo anti-PD-1 12819.15384 se une a PD-1 de ratón con una K_D de 809 pM, pero no reconoce PD-1 de rata. La afinidad por el ECD de PD-1 humana fue similar a la medida en el Ejemplo 7. El anticuerpo 12865.17150 no se unió a PD-1 de ratón o rata. Ninguno de los análogos de referencia de nivolumab y pembrolizumab reaccionaron de forma cruzada con PD-1 de ratón o rata (datos no mostrados).

Tabla 8 Cinética de unión del anticuerpo PD-1 12819.15384 a ECD de PD-1 humana, de ratón o rata medida mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

Anticuerpo	ECD de PD-1	k_{on} (M-1 s-1)		Error k_{on}	k_{off} (s-1)		Error k_{off}	K_D (pM)
[12819.15384]	humano	3.26E+05	±	3E+02	8.85E-06	±	5E-08	28
[12819.15384]	ratón	3,71E+04	±	5E+01	3,04E-05	±	7E-09	809
[12819.15384]	rata	S.N.*	±		S.N.	±		S.N.

*SN: Sin unión.

Ejemplo 10: Análisis de la actividad de bloqueo del ligando PD-L1 y PD-L2 de los mAb PD-1

Este ejemplo ilustra cómo se analizó el panel de anticuerpos anti-PD-1 para determinar la actividad de bloqueo del ligando PD-L1 o PD-L2 realizando un ensayo de competición utilizando análisis de Interferometría de Bio-Capa.

30 Materiales y métodos

La investigación de la actividad de bloqueo del ligando PD-L1 o PD-L2 se realizó mediante análisis de Interferometría de Bio-Capa (BLI) utilizando un instrumento Octet QK384 (ForteBio, EE.UU.). La proteína de fusión Fc de PD-1 humana disponible comercialmente (Sino Biological) a una concentración de 5 g/ml se capturó sobre chips sensores anti-Fc humano (ForteBio, EE.UU.) y los sitios anti-Fc residuales se bloquearon con anticuerpo de control negativo Herceptin®.

35 A continuación, la superficie recubierta con antígeno se saturó con anticuerpo anti-PD-1 a una concentración de 10 µg/ml. Después de la saturación de PD-1 con anticuerpo anti-PD-1, se evaluó la actividad de bloqueo de ligando de PD-L1 o PD-L2 mediante la incubación con proteínas de fusión humanas PD-L1 o PD-L2 Fc (Sino Biological) analizadas a 5 µg/ml.

Resultados

40 El resultado del análisis de competición se presenta en la Tabla 9 a continuación. Todos los anticuerpos bloquearon por completo la unión del ligando PD-L1 o PD-L2, excepto el anticuerpo 12760.13169, que no mostró bloqueo significativo de PD-L1 o PD-L2 (26% y 36%, respectivamente), y 13112.13208, que no mostró bloqueo de PD-L1 y bloqueo débil de PD-L2 (27% y 53%, respectivamente). Los resultados estuvieron de acuerdo con el análisis de establecimiento de familias de epítopos (Ejemplo 8) y el análisis de mapeo de epítopos (Ejemplo 11), que mostró que todos los anticuerpos excepto 12760 y 13112 se unen a epítopos solapantes que se mapean en sitio de unión PD-L1

y PD-L2 en PD-1, mientras que los anticuerpos 12760 y 13112 se unen a un sitio PD-1 por separado y no compiten significativamente de forma cruzada con PD-L1 y PD-L2.

Tabla 9 Inhibición de PD-L1 y PD-L2 después de la saturación de anticuerpos anti-PD-1

mAb	Ligando	% Bloqueo
12748.13354	PD-L1-Fc	97
12748.13354	PD-L2-Fc	
12760.13169	PD-L1-Fc	44
12760.13169	PD-L2-Fc	26
12777.13362	PD-L1-Fc	93
12777.13362	PD-L2-Fc	
12796.13173	PD-L1-Fc	99
12796.13173	PD-L2-Fc	92
12819.13367	PD-L1-Fc	94
12819.13367	PD-L2-Fc	94
12865.13185	PD-L1-Fc	98
12865.13185	PD-L2-Fc	94
12892.13195	PD-L1-Fc	88
12892.13195	PD-L2-Fc	
13112.13208	PD-L1-Fc	53
13112.13208	PD-L2-Fc	27
análogo de nivolumab	PD-L1-Fc	100
análogo de nivolumab	PD-L2-Fc	
análogo de pembrolizumab	PD-L1-Fc	
análogo de pembrolizumab	PD-L2-Fc	
	Bloqueo de ligando no significativo	
50 - 70	Bloqueo de ligando intermedio	
70 - 90	Bloqueo de ligando intermedio	
90 - 100	Bloqueo de ligando completo	

5 **Ejemplo 11: Mapeo de epítopos de anticuerpos anti-PD-1 mediante mutagénesis de PD-1**

Los epítopos de anticuerpos generalmente se pueden caracterizar como epítopos lineales (también denominados epítopos continuos) o epítopos conformacionales (también denominados epítopos discontinuos). Si bien los epítopos lineales se definen basándose en una única secuencia de aminoácidos continua, los epítopos conformacionales pueden consistir en muchas secuencias lineales discontinuas más pequeñas o restos de contacto único. Una colección de restos de contacto que se agrupan en la interfaz proteica intermolecular entre el anticuerpo y el antígeno también se denomina punto caliente o epítopo central (Moreira et al., *Proteins* **68**(4):803-12 (2007)). Ahora se reconoce ampliamente que la mayoría de los epítopos de células B son de naturaleza discontinua (Sivalingam y Shepherd, *Mol Immunol.* **51**(3-4): 304-92012 (2012), Krugelum y col., *Mol Immunol.* **53**(1-2):24-34 (2013)) abarcando el epítopo medio 15-22 restos de aminoácido de los cuales 2-5 aminoácidos contribuyen con la mayor parte de la energía de enlace (Sivalingam y Shepherd, más arriba).

Al clasificar la afinidad de unión a 111 diferentes mutantes de PD-1, este ejemplo ilustra cómo los epítopos de unión de los anticuerpos 12819 y 12865 se pueden dividir en epítopos y puntos de calientes lineales que son distintos de los epítopos reconocidos por nivolumab y pembrolizumab.

Métodos

- 5 El receptor de PD-1 humana consiste en un dominio extracelular de 268 aminoácidos (restos 21-288). El dominio extracelular abarca los aminoácidos 21-170 seguido de un dominio transmembrana (restos 171-191) y un dominio citoplásico (restos 192-288). PD-1 pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y está compuesta por un sándwich β de dos capas formado por interacciones de 8 cadenas β antiparalelas dispuestas en dos láminas β con hebras β de GFCC' en un lado y hebras β ABED en el lado opuesto. Las dos láminas β se estabilizan mediante un enlace disulfuro entre los restos C54-C123. Está disponible una estructura cristalina para PD-1 humana: complejo PD-L1 humano (PDB 4ZQK), pero el bucle C'D entre las cadenas β C' y D no estaba estructurado y falta, así como parte de la secuencia C-terminal después de resto 146 (PDB 4ZQK, Zak y col., *Structure* **23**(12):2341-2348 (2015)). Recientemente, se ha publicado una estructura cristalina del complejo PD-1 humana:pembrolizumab (PDB 5JXE, Na y col., *Cell Res.* 2016 [Publicación electrónica antes de impresión], PMID:27325296). En esta estructura, el bucle C'D está mucho más ordenado y se mostró que los restos de contacto importantes para la unión del pembrolizumab se agruparon en un epítopo central en este bucle. No está disponible la estructura cristalina del complejo PD-1 humana:PD-L2 humano. Una estructura de RMN de PD-1 humana en solución muestra una alta similitud estructural con la estructura cristalina de PDB 4ZQK (PDB 2M2D, Cheng y col., *J Biol Chem* **288**(17):11771-85 (2013)). La PD-1 humana se une a ligandos PD-L1 o PD-L2 humanos con una estequiometría 1:1 y la unión se produce principalmente en sitios de unión solapantes mediados por la lámina β de GFCC' (Cheng y col., *J Biol Chem* **288**(17):11771-11785 (2013)) (Figura 9, paneles A y B). PD-L1 humano se une a PD-1 humana a través de los restos de contacto V64, N66, Y68 situados en la hebra β de C y G124, 1126, L128, A132, 1134 y E136 ubicados en las hebras β de F y G (Zak y col., *Structure* **23**(12):2341-8 (2015)). PD-L1 y PD-L2 humanos se unen a PD-1 humana con K_D de 8 μM y 2 μM , respectivamente (Cheng et al., más arriba).
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- El receptor de PD-1 humana se une a ligandos PD-L1 o PD-L2 humanos con una estequiometría 1:1 y la unión se produce principalmente en sitios de unión solapantes mediados por la lámina β de GFCC' (Cheng y col., *J Biol Chem* **288**(17):11771-11785 (2013)) (Figura 9, paneles A y B). PD-L1 humano se une a PD-1 humana a través de los restos de contacto V64, N66, Y68 situados en la hebra β de C y G124, 1126, L128, A132, 1134 y E136 ubicados en las hebras β de F y G (Zak y col., *Structure* **23**(12):2341-8 (2015)). PD-L1 y PD-L2 humanos se unen a PD-1 humana con K_D de 8 μM y 2 μM , respectivamente (Cheng et al., más arriba).
- La secuencia de proteína de PD-1 humana se descargó de Uniprot (Núm. de acceso Q15116, la secuencia de aminoácidos se representa en SEQ ID NO: 1). La secuencia de proteína de *Macaca fascicularis* completa se descargó de Uniprot (Núm. de acceso) B0LAJ3_MACFA (SEQ ID NO: 89)). Las secuencias de proteína completas de PD-1 de *Gallus gallus*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* se descargaron de NCBI (XP_422723. (SEQ ID NO: 90), NP_032824.1 (SEQ ID NO: 91) y XP_006245633.1 (SEQ ID. NO: 92), respectivamente). Las identidades de secuencia de las diferentes secuencias de aminoácidos extracelulares de PD-1 en comparación con PD-1 humana se muestran en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10 Comparación de secuencia de ECD de PD-1 entre especies

	Diferencias de Aminoácidos	% de Identidad de Secuencia
ECD de PD-1 de <i>Macaca fascicularis</i>	6	96,0
ECD de PD-1 de <i>Rattus norvegicus</i>	50	66,7
ECD de PD-1 de <i>Mus musculus</i>	57	62,0
ECD de PD-1 de <i>Gallus</i>	73	51,3

Se construyó un modelo molecular de PD-1 humana combinando información estructural de la estructura cristalina del complejo PD-1 humana:PD-L1 humano determinado a una resolución de 2,45 \AA (PDB 4ZQK) y una estructura de RMN de PD-1 humana de APO (PDB 2M2D). La estructura PDB 4ZQK se utilizó como la base para el modelo con el bucle de CD perdido y la porción C-terminal de PD-1 proporcionada a partir de la estructura de RMN. A continuación, se destacaron los restos de aminoácidos expuestos en la superficie y se diseñaron 83 sustituciones de alanina individuales en restos expuestos en superficie en ECD de PD-1 humana (barrido de alanina) y 5 posiciones de restos expuestos que difirieron entre PD-1 humana, de ratón y de rata, para rastrear restos de PD-1.

Para mapear epítopos de anticuerpos lineales en el contexto de la estructura de PD-1 humana nativa, se generaron 23 proteínas químéricas donde 10 aminoácidos en la secuencia de ECD de PD-1 humana se intercambiaron secuencialmente por secuencia de pollo en segmentos que se solapaban con 5 aminoácidos. Se realizaron intercambios de secuencias en el dominio extracelular de PD-1 humana que abarcaban los aminoácidos 31-146, ya que la secuencia de la proteína de *Gallus gallus* fuera de este segmento no se alineó bien con PD-1 humana y se omitió.

El ADNr de PD-1 que codifica el dominio extracelular de PD-1 humana se sintetizó y se clonó en un vector que contenía el promotor de CMV y la secuencia de Fc de IgG1 humana (restos P101-K330) dando como resultado la fusión de Fc de IgG1 C-terminalmente al ECD de PD-1 clonado. Las construcciones de fusión de Fc de PD-1 humanos mutados se generaron mediante técnicas de ingeniería genética y PCR convencionales y la proteína se expresó transitoriamente

en 2 ml de cultivo utilizando un sistema de expresión ExpiCHO™. Las construcciones de fusión de Fc de PD-1 humana se recogieron después de 9 días y los sobrenadantes se sometieron a ensayo para determinar la afinidad de unión a los Fab anti-PD-1 por medio de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). Los sobrenadantes de cultivo que contenían proteínas de fusión de PD-1 se inmovilizaron en un SensEye® (Ssens BV, Países Bajos) para G-a-hu-IgG 5 Fc durante 15 minutos utilizando un Microspotter de Flujo Continuo (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, EE.UU.). Después de la aplicación, el SensEye® se colocó en un biosensor IBIS MX96 y las proteínas capturadas se fijaron a la superficie con el kit FixIT (Ssens BV, Países Bajos). El análisis cinético se realizó aplicando la denominada serie de titulación cinética (Karlsson R. 2006), donde se inyectaron fragmentos Fab monoméricos de los anticuerpos 10 de la invención a concentraciones crecientes de 1 nM a 50 nM sin aplicación de etapas de regeneración de superficie después de cada inyección de antígeno. La asociación de Fab se realizó durante 15 minutos y la disociación del antígeno se realizó durante 30 minutos. Las respuestas de unión registradas se ajustaron a un modelo simple de unión Langmuir 1:1 con el soporte lógico Scrubber 2 para el cálculo de las constantes de velocidad de asociación (k_{on} o ka), velocidad de disociación (k_{off} o k_d) y de afinidad (K_D).

Resultados

15 Se evaluaron las afinidades de unión de los Fab anti-PD-1 12819.17149 y 12865.17150 y los análogos de referencia nivolumab y pembrolizumab. 12819.17149 y 12865.17150 tienen secuencias de aminoácidos de VH y VL idénticas a 12819.15384 y 12865.15377, respectivamente, pero se identifican por diferentes números de 10 dígitos porque las 20 secuencias de cadena pesada y ligera de cada una de las dos primeras variantes se expresaron conjuntamente en el mismo plásmido en lugar de en plásmidos separados en las células anfitrionas. El Fab 13112.15380 y Herceptin® que no bloquean los ligandos PD-L1 y PD-L2 se incluyeron como controles.

25 Los 111 mutantes de PD-1 sometidos a ensayo se expresaron bien. Solo tres construcciones químéricas no se unieron a ninguno de los anticuerpos sometidos a ensayo, lo que sugiere que las mutaciones introducidas en estas tres construcciones presumiblemente dieron como resultado perturbaciones conformacionales mayores que afectaron a la 30 unión de todos los anticuerpos PD-1 sometidos a ensayo. El cambio en la afinidad de unión de los anticuerpos Fab que se unen a las construcciones de PD-1 mutadas en comparación con el tipo salvaje se expresaron como la razón de K_D mutante/ K_D de tipo salvaje (afinidad de unión normalizada). En la Tabla 11 siguiente se muestra una visión general de la exploración del epítopo lineal realizada mediante la inserción de secuencias de Gallus gallus de 10 aminoácidos en el ECD de PD-1 humana. Se empleó al menos una reducción de afinidad 5 veces mayor como criterio de corte para detectar la reducción de la afinidad de unión a las construcciones de PD-1 mutada. En algunos casos, no se pudo detectar unión a anticuerpos específicos. Estas construcciones se enumeraron como S.U. (sin unión).

También se mapearon los restos de contacto único realizando 83 sustituciones de alanina o 5 retromutaciones en rata (Tabla 12 a continuación).

35 Una descripción de los epítopos lineales o restos de contacto identificados para anticuerpos sometidos a ensayo se presenta en la Tabla 13. En la Figura 9 se muestra una ilustración de los epítopos de unión mapeados mostrados como gráficos de densidad en la estructura de ECD de PD-1 humana.

40 El análisis mostró que los epítopos de unión de los anticuerpos anti-PD-1 de 12819 y 12865 eran claramente distintos en comparación con los anticuerpos de referencia nivolumab y pembrolizumab (Tablas 11-13, Figura 9). El epítopo central de pembrolizumab (Figura 9, panel C) se localizó en la hebra β de C' y en el bucle C'-D. También se encontraron restos de contacto/epítopos lineales en las hebras β de C y F, donde también hay restos de contacto para PD-L1. El 45 epítopo central de nivolumab (Figura 9, panel D) estaba presente en el extremo de la hebra β de F y en la hebra β de G completa que cubre algunos de los restos de contacto de PD-1 referidos utilizados por PD-L1 humana. Los epítopos centrales de 12819 y 12865 (Figura 9, paneles E y F) se localizaron en las hebras β de F y G cubriendo más área que nivolumab y solapándose con todos los restos de contacto referidos para PD-L1 humana en esta región. 12865 también fue muy sensible a las mutaciones en los restos 69-75. 12819 también compartió un resto de contacto con pembrolizumab (V64) en la hebra β de C que también se ha informado que es un resto de contacto para PD-L1 humana. Tanto 12819 como 12865 comparten epítopos lineales que se mapean en las hebras β de C y C' y parte del bucle CD. Además del resto V64, no se compartieron otros restos de contacto entre los anticuerpos sometidos a ensayo. El anticuerpo 13112 no bloqueante del ligando se mostró mediante barrido de alanina para mapear una región distante del sitio de bloqueo del ligando PD-L1 y PD-L2 (Figura 9, panel G).

50 En resumen, este ejemplo ilustra que, aunque 12819, 12865, nivolumab y pembrolizumab se unen a epítopos solapantes en PD-1 humana que pueden bloquear la unión de ligandos PD-L1 y PD-L2, cada anticuerpo tiene un epítopo de unión distinto como se evidenciado a partir del análisis de unión competitiva (agrupación de epítopos, Ejemplo 8) y se muestra a nivel molecular mapeando epítopos lineales individuales y restos de contacto con un panel de 111 mutantes de PD-1 como se resume en la Tabla 13. 12819 es también el único anticuerpo en el panel anti-PD-1 investigado que reacciona de forma cruzada con ECD de PD-1 de ratón (K_D de 809 pM, Ejemplo 9), destacando que el epítopo de unión de este anticuerpo es único en comparación con los otros anticuerpos PD-1 sometidos a ensayo.

Tabla 11 Análisis de afinidad de unión para anticuerpos Fab que se unen a construcciones de ECD de PD-1 químéricas con segmentos* de secuencia de *Gallus gallus* insertados

Núm.	Región barrida de PD-1 hu	Región Mutada de PD-1 hu introducidas	Mutaciones de <i>Gallus gallus</i>	12819;17149	12865;17150	nivolumab	pembrolizumab	13112;15380
1	31-40	AA 37-38	F37L;S38F	1,2	0,6	0,4	0,9	0,4
2	36-45	AA 37-45	F37L;S38F;L41T;V43I;V44R;T45P	2,3	0,7	0,9	0,5	1,0
3	41-50	AA 41-49	L41T;V43I;V44R;T45P;E46A;D48S; N49S	1,3	0,6	0,5	0,6	0,7
4	46-55	AA 46-55	E46A;D48S;N49S;T53I;S55N	0,3	0,6	0,5	0,6	0,6
5	51-60	AA 53-59	T53I;S55N;S56I;T59S	1,2	0,9	0,8	0,9	2,5
6	56-65	AA 56-64	F56I;T59S;E61L;S62E;V64N	7,1	0,2	0,9	1,0	0,8
8	66-75	AA 69-75	R69Q;M70K;S71T;P72N;S73N; N74S;Q75N	6,4	S.U.	1,2	0,9	1,6
10	76-85	AA 76-85	T76P;D77Q;L79I;A81G;F82I; P83IE84R;D85N	33,7	13,8	0,8	S.U.	1,0
11	81-90	AA 81-90	A81G;F82I;P83IE84R;D85N;R86I; S87P;P89K;G90K	47,7	5,4	2,0	S.U.	0,8
12	86-95	AA 86-95	R86I;S87P;P89K;G90K;Q91M;D92E; R94K; F95Y	2,2	0,6	0,5	S.U.	0,6
15	101-110	AA 103-110	G103T;R104P;D105V;H107K; S109E;V110I	1,3	0,8	0,9	0,6	0,9
16	106-115	AA 107-115	H107K;S109E;V110I;V111L;R112N; A113I; R114H R115Q	3,6	0,4	0,6	0,7	0,7
17	111-120	AA 111-120	V111L;R112N;A113L;R114H R115Q;T112F	0,2	0,5	0,4	0,7	0,7

18	116-125	AA 120-125	T120F;L122Y;A125L	3,8	4,6	2,7	8,8	1,5
19	121-130	AA 122-130	L122Y;A125L;S127T;L128F;A129S; P130R	175,0	S.U.	0,8	2,3	0,8
20	126-135	AA 127-135	S127T;L128F;A129S;P130R;K131S; A132D;Q133K;I134VK135V	S.U.	S.U.	S.U.	3,7	0,6
21	131-140	AA 131-140	K131S;A132D;Q133K;I134VK135V; L138S;R139H;A140S	S.U.	S.U.	1,0	3,1	0,5
22	136-145	AA 138-143	L138S;R139H;A140S;E141Q;R143V	1,9	1,0	0,5	0,8	1,0
23	141-146	AA 141-143	E141Q;R143V	1,7	1,0	0,5	1,1	1,5
		KD ECD PD-1 Hu tipo salvaje (nM)	2,68E-11	3,38E-09	5,67E-09	6,08E-09	1,24E-09	
Mutantes quiméricos								
cambio de K _D < 5 veces								
Mutantes quiméricos								
cambio de K _D 5-10 veces								
Mutantes quiméricos								
cambio de K _D 10 - 50 veces								
Mutantes quiméricos								
cambio de K _D 50 - 1000 veces								
Sin unión de mutantes								
químicos								
S.U.								

*Se enumera la unión normalizada expresada como K_D del mutante/K_D del tipo salvaje

ES 2 924 402 T3

Tabla 12 Afinidad de unión del anticuerpo Fab a restos de ECD de PD-1 humana barridos con alanina*

Mutación	12819.1 7149	12865.1 7150	nivolumab	pembrolizumab	13112.1 5380
P21A	2,1	1,0	0,5	0,6	1,1
G22A	1,0	0,9	0,6	0,8	1,0
D26A	1,1	0,8	1,7	0,7	1,2
S27A	0,8	0,8	2,7	0,8	1,1
D29A	1,0	0,9	1,7	0,7	1,0
R30A	1,2	1,2	1,9	1,3	1,0
P31A	1,1	1,0	2,6	1,0	1,1
N33A	1,0	1,1	0,8	0,8	1,0
T36A	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9
L42A	1,3	0,5	0,3	0,2	2,2
V44A	1,4	0,8	0,5	0,3	9,9
G47A	1,6	0,5	0,2	0,2	0,6
D48A	1,0	0,6	0,6	0,4	2,4
N49A	1,1	0,7	0,5	0,5	1,0
A50G	1,4	0,6	0,5	0,4	1,7
F56A	1,5	0,5	1,7	0,6	0,8
S57A	1,2	1,0	0,9	0,9	1,1
N58A	1,3	0,7	1,9	0,7	1,0
T59A	0,9	1,0	1,3	0,3	0,9
S60A	1,8	0,6	1,5	0,7	1,0
E61A	1,2	1,1	0,5	0,3	1,0
N66A	2,2	2,1	0,8	201,3	1,0
Y68A	2,2	1,4	0,2	0,2	0,8
S71A	0,9	0,9	0,6	0,6	0,9
P72A	1,1	1,8	0,9	0,8	1,0
S73A	0,9	0,5	0,9	0,7	0,9
Q75A	1,0	0,5	1,0	0,8	0,9
T76A	1,4	0,3	1,2	0,9	1,2
D77A	2,8	0,3	1,0	134,2	1,0
K78A	2,6	0,7	1,0	268,5	1,1
A80G	1,2	0,4	1,1	0,8	1,0
P83A	1,5	0,8	0,9	S.U.	0,9
E84A	1,3	1,0	0,8	1,3	1,0

ES 2 924 402 T3

Mutación	12819.1 7149	12865.1 7150	nivolumab	pembrolizumab	13112.1 5380
D85A	2,5	1,6	0,6	S.U.	0,9
R86A	1,1	0,7	0,4	0,3	0,9
S87A	1,3	0,9	0,8	107,4	1,0
Q88A	1,4	1,4	0,8	0,2	0,9
P89A	1,1	0,9	1,1	S.U.	0,9
G90A	1,0	0,8	1,0	671,1	1,0
Q91A	0,8	1,0	1,0	0,7	1,0
D92A	1,2	0,8	1,0	335,6	0,9
C93A	1,2	0,9	1,1	1,2	1,1
R96A	1,0	0,8	0,9	0,5	1,0
T98A	1,1	0,9	0,8	0,6	1,0
P101A	1,1	1,0	0,6	0,5	0,9
N102A	1,5	0,6	0,2	0,3	0,7
G103A	1,1	0,8	0,5	0,5	0,9
R104A	1,0	0,8	0,6	0,4	0,7
R112A	0,7	0,9	0,8	0,6	0,9
R114A	0,8	0,8	0,7	0,6	0,9
N116A	1,4	0,8	0,6	0,6	0,9
G119A	1,0	0,4	0,5	0,5	1,0
G124A	0,5	4,0	0,3	0,6	1,0
L128A	17,1	2,1	1,5	335,6	0,9
P130A	105,1	0,5	2,6	0,6	0,9
K131A	S.U.	S.U.	1,0	1,6	0,9
A132G	53,4	1,4	0,9	0,5	1,0
Q133A	0,7	1,4	1,2	0,6	0,9
K135A	4,2	1,1	0,7	1,4	1,2
E136A	0,8	S.U.	0,9	0,9	1,0
L138A	1,0	1,1	1,0	1,0	1,2
R143A	0,9	0,7	0,7	0,5	1,0
T145A	1,1	0,7	0,9	0,5	82,4
E146A	1,2	1,0	1,0	0,9	1,0
R147A	0,7	1,0	0,8	0,7	0,7
R148A	0,3	1,0	0,8	0,8	1,1
A149G	0,8	1,0	0,8	0,8	1,0

Mutación	12819.1 7149	12865.1 7150	nivolumab	pembrolizumab	13112.1 5380
E150A	1,0	1,0	0,7	0,7	1,0
P152A	1,4	0,9	0,6	0,6	1,0
T153A	0,9	1,0	0,9	0,9	1,0
A154G	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0
H155A	1,1	1,0	1,3	1,2	1,0
P156A	1,0	1,1	2,2	1,2	1,5
S157A	0,9	1,0	2,2	1,8	1,0
P158A	1,2	0,9	0,9	0,9	1,0
S159A	1,1	0,8	0,7	0,7	0,9
P160A	1,0	0,8	0,9	0,7	1,0
R161A	0,9	1,1	1,0	1,1	1,1
P162A	1,3	1,1	1,0	1,0	1,1
A163G	1,0	1,1	0,8	0,8	1,1
G164A	1,1	0,9	0,5	0,6	1,0
Q165A	1,1	1,1	0,9	1,0	1,1
Mutación en rata Q167A	0,8	1,0	0,8	0,7	0,9
Mutación en rata P28L	1,9	0,5	0,8	0,7	0,7
Mutación en rata R30K	2,9	0,5	0,5	1,1	0,7
Mutación en rata A40T	2,0	1,0	0,8	0,8	0,6
Mutación en rata V64K	35,7	1,3	0,7	S.U.	1,0
Mutación en rata S157R	1,6	0,9	0,9	0,8	1,0
K _D de ECD de PD-1 hu (nM)	2,68E- 11	3,38E- 09	5,67E-09	6,08E-09	1,24E- 09
	Cambio de K _D < 5 veces Mutantes para Alanina				
5-10	Cambio de K _D 5-10 veces Mutantes para Alanina				
10-50	Cambio de K _D 10 - 50 veces Mutantes para Alanina				
50-1000	Cambio de K _D 50 - 1000 veces Mutantes para Alanina				
S.U.	Sin unión de mutantes para alanina				

* Se enumera la unión normalizada expresada como K_D de mutante/K_D de tipo salvaje.

Tabla 13 Epítopos de unión a anticuerpos anti-PD-1 identificados mediante el uso de construcciones de fusión de Fc de PD-1 mutadas

Anticuerpo	Bloqueo significativo de PD-L1/L2	Bin de Epítopo	Epítopo Lineal	Residuos de Contacto
12819.17149	Si	1C	56–64, 69–90, 122–140	V64, L128, P130, K131, A132
12865.17150	Si	1E	69–90, 122–140	K131, E136
nivolumab	Si	1D	127–135	
pembrolizumab	Yes	1F	56–64, 76–95, 120–125	V64, N66, D77, K78, P83, D85, S87, P89, G90, D92, L128
13112.15380	No	2		V44, T145

5 Ejemplo 12: Eficacia *in vivo* de un anticuerpo 12819 en cuatro modelos singénicos de tumores murinos

Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de un anticuerpo 12819 en cuatro modelos singénicos de tumores murinos.

Métodos

Se inocularon por vía subcutánea 2×10^5 células Sa1N (fibrosarcoma), 1×10^6 células CT26 (carcinoma de colon), 5×10^6 células ASB-XIV (carcinoma de pulmón), o 8×10^6 células MC38 (carcinoma de colon) en el flanco de ratones hembra de 6-8 semanas de edad A/J (Sa1N), BALB/cAnNRj (CT26 y ASB-XIV), o C57BL/6 (MC38). Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibre en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm^3 se calculó de acuerdo con la fórmula: $(\text{anchura})^2 \times \text{longitud} \times 0,5$. Con un tamaño promedio de tumor de 30-50 mm^3 , los ratones se dividieron al azar en dos grupos de diez animales y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces a la semana con un total de seis tratamientos mediante inyección intraperitoneal de tampón de vehículo o el anticuerpo monoclonal 12819.17149 seguido de un período de observación. Los tratamientos con anticuerpos se dosificaron a 10 mg/kg. Se aplicó ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para comparar volúmenes de tumores en cada punto temporal entre grupos de tratamiento. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

Los resultados muestran un efecto inhibidor tumoral profundo del anticuerpo 12819.17149 en todos los modelos tumorales singénicos sometidos a ensayo ($P < 0,001$ frente a vehículo) (Figura 10). El anticuerpo 12819.17149 indujo la regresión del crecimiento tumoral en el modelo de tumor Sa1N y dio como resultado un retraso del crecimiento tumoral en los modelos tumorales CT26, MC38 y ASB-XIV.

25 Ejemplo 13: Eficacia *in vivo* de un anticuerpo 12819 en un modelo de tumor de xenoinjerto semihumanizado con una mezcla de células T CD8⁺/CD4⁺ y células de melanoma A375

Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de un anticuerpo 12819 en un modelo de tumor de xenoinjerto semihumanizado, en el que la línea celular de melanoma humano A375 se mezcló con células T humanas CD8⁺ y CD4⁺ purificadas.

Métodos

Se aislaron $4,5 \times 10^5$ células T CD8⁺ y CD4⁺ de un donante de PBMC humano y se mezclaron con $2,05 \times 10^6$ células de cáncer A375 (melanoma humano) antes de la inoculación subcutánea en el flanco de ratones NOD scdi hembra de 6-8 semanas de edad. El tratamiento se inició el día de la inoculación del tumor y los ratones se trataron tres veces a la semana para un total de seis tratamientos mediante inyección intraperitoneal de tampón de vehículo, Keytruda® (pembrolizumab) (10 mg/kg) o el anticuerpo monoclonal 12819.17149 (10 mg/kg) seguido de un período de observación. Los tumores se midieron tres veces a la semana mediante un calibre en dos dimensiones y se calculó el

volumen del tumor en mm³ de acuerdo con la fórmula: (ancho)² x longitud x 0,5. Se aplicó ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para comparar los volúmenes tumorales en cada punto temporal entre los grupos de tratamiento. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

5 Resultados

En el modelo de tumor semihumanizado, el tratamiento con el anticuerpo 12819.17149 dio como resultado un retraso significativo del crecimiento tumoral ($P <0,001$ frente a vehículo), mientras que Keytruda® mostró un efecto limitado sobre el crecimiento tumoral en comparación con el grupo tratado con vehículo (Figura 11).

Tabla 14 Lista de SEQ ID NO

SEQ ID NO	Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de PD-1 humana
2	Secuencia de aminoácidos de V _H [12819.15384] humanizado
3	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12819.15384] humanizado
4	Secuencia de aminoácidos de V _H [12748.15381] humanizado
5	Secuencia de aminoácidos de V _L [12748.15381] humanizado
6	Secuencia de aminoácidos de V _H [12865.15377] humanizado
7	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12865.15377] humanizado
8	Secuencia de aminoácidos de V _H de [12892.15378] humanizado
9	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12892.15378] humanizado
10	Secuencia de aminoácidos de V _H de [12796.15376] humanizado
11	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12796.15376] humanizado
12	Secuencia de aminoácidos de V _H de [12777.15382] humanizado
13	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12777.15382] humanizado
14	Secuencia de aminoácidos de V _H de [12760.15375] humanizado
15	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12760.15375] humanizado
16	Secuencia de aminoácidos de V _H de [13112.15380] humanizado
17	Secuencia de aminoácidos de V _L [13112.15380] humanizado
18-65	Secuencias CDR; véanse los SEQ ID NO en la Tabla 2 y las secuencias de la Tabla 5, así como la Lista de Secuencias de más abajo
66	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12748.16124] humanizado (línea germinal alternativa)
67	Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 (variante LALA)
68	Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera
69	Secuencia de ADN de V _H de [12819.15384] humanizado
70	Secuencia de ADN de V _L de [12819.15384] humanizado
71	Secuencia de ADN de V _H de [12748.15381] humanizado
72	Secuencia de ADN de V _L de [12748.15381] humanizado
73	Secuencia de ADN de V _H de [12865.15377] humanizado
74	Secuencia de ADN de V _L de [12865.15377] humanizado

75	Secuencia de ADN de V _H de [12892.15378] humanizado
76	Secuencia de ADN de V _L de [12892.15378] humanizado
77	Secuencia de ADN de V _H de [12796.15376] humanizado
78	Secuencia de ADN de V _L de [12796.15376] humanizado
79	Secuencia de ADN de V _H de [12777.15382] humanizado
80	Secuencia de ADN de V _L de [12777.15382] humanizado
81	Secuencia de ADN de V _H de [12760.15375] humanizado
82	Secuencia de ADN de V _L de [12760.15375] humanizado
83	Secuencia de ADN de V _H de [13112.15380] humanizado
84	Secuencia de ADN de V _L de [13112.15380] humanizado
85	Secuencia de ADN de V _L de [12748.16124] humanizado (línea germinal alternativa)
86	Secuencia de ADN genómico de la región constante de la cadena pesada con intrones incluidos
87	Secuencia de ADNc de la región constante de cadena pesada
88	Secuencia de ADNc de la región constante Lambda de cadena ligera
89	Polipéptido PD-1 de Macaca fascicularis, NCBI Acceso B0LAJ3_MACFA
90	Polipéptido PD-1 de Gallus gallus, Núm. de Acceso NCBI XP_422723.3
91	Polipéptido PD-1 de Mus musculus, Núm. de Acceso NCBI NP_032824.1
92	Polipéptido PD-1 de Rattus norvegicus, Núm. de Acceso NCBI XP_006245633.1

Lista de Secuencias

* La cursiva en las secuencias de ADN indica sitios de clonación

SEQ ID NO: 1 (Polipéptido PD-1 humano, Núm. de Acceso Uniprot Q15116 (PDCD1_HUMAN))

5

MQIPQAPWPVVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPNPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTS
 ESFVLNWYRMSPSNQTDKLAFFPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGT
 YLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAQQFQTLVVGVVGGLGS
 LVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVP

10

CVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

SEQ ID NO: 2 (Secuencia de aminoácidos de V_H de [12819.15384] humanizado)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTRYDMVVVRQAPGKGLEWVAGIGDSNKMTRYAPAVKGRATISRDN
 KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSCIACWDEAGRIDAWGQGTLTVSS

15

SEQ ID NO: 3 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [12819.15384] humanizado)

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCGGGSYDGSSYYGWYQQKPGQAPVTVIYNNNNRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTIT
 GAQAEDEADYYCGSYDRPETNSDYVGMFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 4 (Secuencia de aminoácidos de V_H de [12748.15381] y [12748.16124] humanizado)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMNWVRQAPGKGLEWVAGIGNDSYTNYGAAVKGRATISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASDIRSRNDCSYFLGGCSSGFIDVWGQGTLTVSS

5 SEQ ID NO: 5 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [12748.15381] humanizado)

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGSSYSYGWFQQKPGQAPVTVIYESNNRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQA
EDEADYYCGNADSSGIFGSGTKVTL

SEQ ID NO: 6 (Secuencia de aminoácidos de V_H de [12865.15377] humanizado)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSDHGMQWVRQAPGKGLEYVGVIDTTGRYTYYAPAVKGRATISRDNSK
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTCVGGYLCNTVGSIDAWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 7 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [12865.15377] humanizado)

15 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGSSSSYYGKYQQKPGQAPVTVIYDDTNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQ
AEDEADYYCGGYEGSSHAGIFGSGTKVTL

SEQ ID NO: 8 (Secuencia de aminoácidos de V_H de [12892.15378] humanizado)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSYTMQWVRQAPGKGLEWVGVISSTGGSTGYGPAVKGRATISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKSISGDAWSVDGLDAWGQGTLTVSS

20 SEQ ID NO: 9 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [12892.15378] humanizado)
SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSAYGKYQQKPGQAPVTVIYNNQRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
DEADYYCGSYDSSAVGIFGSGTKVTL

25 SEQ ID NO: 10 (Secuencia de aminoácidos de V_H de [12796.15376] humanizado)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSYTMQWVRQAPGKGLEWVGVISSTGGSTGYGPAVKGRATISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKSISGDAWSVDGLDAWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 11 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [12796.15376] humanizado)

30 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGGSAYGKYQQKPGQAPVTVIYNNQRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
DEADYYCGSYDSSAVGIFGSGTKVTL

SEQ ID NO: 12 (Secuencia de aminoácidos de V_H de [12777.15382] humanizado)

35 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDSSYGMQWVRQAPGKGLEWVGVISGSGITLYAPAVKGRATISRDNSK
NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSPSITDGWTYGGAWIDAWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 13 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [12777.15382] humanizado)

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGDGSYGWFQQKPGQAPVTVIYDNDNRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAE
DEADYYCGNADLSGGIFGSGTKVTL

40 SEQ ID NO: 14 (Secuencia de aminoácidos de V_H de [12760.15375] humanizado)

ES 2 924 402 T3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTFNMVWVRQAPGKGLEYVAEISSDGSFTWYATAVKGRATISRDNSK
NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSDCSSYYGYSCIGIIDAWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 15 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [12760.15375] humanizado)

5 SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGISDDGSYYYGWFQQKPGQAPVTVIYINDRRPSNIPDRFSGSSSGNTASLTITG
AQAEDADYYCGSYDSSAGVGIFGSGTKVTVL

SEQ ID NO: 16 (Secuencia de aminoácidos de V_H de [13112.15380] humanizado)

10 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMFWVRQAPGKGLEFVAEISGSNTGSRTWYAPAVKGRATISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSIYGGYCAGGYSCGVGLIDAWGQGTLTVSS

SEQ ID NO: 17 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [13112.15380] humanizado)

SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGGSSDYYGWFQQKPGQAPVTVIYNNKRPSDIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQA
EDEADYYCGNADSSVGFGSGTKVTVL

15

SEQ ID NO: 18 (secuencia de aminoácidos de HCDR1 de 12819)

GFTFTRYD

SEQ ID NO: 19 (secuencia de aminoácidos de HCDR2 de 12819)

20 IGDSNKMT

SEQ ID NO: 20 (secuencia de aminoácidos de HCDR3 de 12819)

CAKGSCIACWDEAGRIDA

25 SEQ ID NO: 21 (secuencia de aminoácidos de LCDR1 de 12819)

GSYDGSSY

SEQ ID NO: 22 (secuencia de aminoácidos de LCDR2 de 12819)

30 NNN

30

SEQ ID NO: 23 (secuencia de aminoácidos de LCDR3 de 12819)

CGSYDRPETNSDYVGMF

SEQ ID NO: 24 (secuencia de aminoácidos de HCDR1 de 12748)

35 GFTFSDYA

SEQ ID NO: 25 (secuencia de aminoácidos de HCDR2 de 12748)

IGNDGSYT

SEQ ID NO: 26 (secuencia de aminoácidos de HCDR3 de 12748)

CASDIRSRNDCSYFLGGCSSGFIDVW

5 SEQ ID NO: 27 (secuencia de aminoácidos de LCDR1 de 12748)

SSYS

SEQ ID NO: 28 (secuencia de aminoácidos de LCDR2 de 12748)

ESN

10

SEQ ID NO: 29 (secuencia de aminoácidos de LCDR3 de 12748)

CGNADSSSGIF

SEQ ID NO: 30 (secuencia de aminoácidos de HCDR1 de 12865)

15 GFDFSDHG

SEQ ID NO: 31 (secuencia de aminoácidos de HCDR2 de 12865)

IDTTGRYT

20 SEQ ID NO: 32 (secuencia de aminoácidos de HCDR3 de 12865)

CAKTTCVGGYLCNTVGSI

SEQ ID NO: 33 (secuencia de aminoácidos de LCDR1 de 12865)

GSSSY

25

SEQ ID NO: 34 (secuencia de aminoácidos de LCDR2 de 12865)

DDT

SEQ ID NO: 35 (secuencia de aminoácidos de LCDR3 de 12865)

30 CGGYEGSSHAGIF

SEQ ID NO: 36 (secuencia de aminoácidos de HCDR1 de 12892)

GFDFSSYT

35 SEQ ID NO: 37 (secuencia de aminoácidos de HCDR2 de 12892)

ISSTGGST

ES 2 924 402 T3

SEQ ID NO: 38 (secuencia de aminoácidos de HCDR3 de 12892)

CVKSISGDAWSVDGLDAW

SEQ ID NO: 39 (secuencia de aminoácidos de LCDR1 de 12892)

5 GSA

SEQ ID NO: 40 (secuencia de aminoácidos de LCDR2 de 12892)

YNN

10 SEQ ID NO: 41 (secuencia de aminoácidos de LCDR3 de 12892)

CGSYDSSAVGIF

SEQ ID NO: 42 (secuencia de aminoácidos de HCDR1 de 12796)

GFDFSSYT

15

SEQ ID NO: 43 (secuencia de aminoácidos de HCDR2 de 12796)

ISSTGGST

SEQ ID NO: 44 (secuencia de aminoácidos de HCDR3 de 12796)

20 CVKSISGDAWSVDGLDAW

SEQ ID NO: 45 (secuencia de aminoácidos de LCDR1 de 12796)

GSA

25 SEQ ID NO: 46 (secuencia de aminoácidos de LCDR2 de 12796)

YNN

SEQ ID NO: 47 (secuencia de aminoácidos de LCDR3 de 12796)

CGSYDSSAVGIF

30

SEQ ID NO: 48 (secuencia de aminoácidos de HCDR1 de 12777)

GFDFSSYG

SEQ ID NO: 49 (secuencia de aminoácidos de HCDR2 de 12777)

35 ISGSGITT

SEQ ID NO: 50 (secuencia de aminoácidos de HCDR3 de 12777)

CTRSPSITDGWTYGGAWIDAW

SEQ ID NO: 51 (secuencia de aminoácidos de LCDR1 de 12777)

DGS

5

SEQ ID NO: 52 (secuencia de aminoácidos de LCDR2 de 12777)

DND

SEQ ID NO: 53 (secuencia de aminoácidos de LCDR3 de 12777)

10 CGNADLSGGIF

SEQ ID NO: 54 (secuencia de aminoácidos de HCDR1 de 12760)

GFTFSTFN

15 SEQ ID NO: 55 (secuencia de aminoácidos de HCDR2 de 12760)

ISSDGSFT

SEQ ID NO: 56 (secuencia de aminoácidos de HCDR3 de 12760)

CAKSDCSSYYGYSCIGIIDAW

20

SEQ ID NO: 57 (secuencia de aminoácidos de 12760 LCDR1)

ISDDGSYY

SEQ ID NO: 58 (secuencia de aminoácidos de LCDR2 de 12760)

25 IND

SEQ ID NO: 59 (secuencia de aminoácidos de LCDR3 de 12760)

CGSYDSSAGVGIF

30 SEQ ID NO: 60 (secuencia de aminoácidos de HCDR1 de 13112)

GFTFSSYN

SEQ ID NO: 61 (secuencia de aminoácidos de HCDR2 de 13112)

ISGSNTGSRT

35

SEQ ID NO: 62 (secuencia de aminoácidos de HCDR3 de 13112)

CAKSIYGGYCAGGYSCGVGLIDAW

SEQ ID NO: 63 (secuencia de aminoácidos de LCDR1 de 13112)

SSDY

5 SEQ ID NO: 64 (secuencia de aminoácidos de LCDR2 de 13112)

YNN

SEQ ID NO: 65 (secuencia de aminoácidos de LCDR3 de 13112)

CGNADSSVGVF

10

SEQ ID NO: 66 (Secuencia de aminoácidos de V_L de [12748.16124] humanizado (línea germinal alternativa))

SYELTQPPSVSPGQTARITCSGGSSYSYGWFQQKPGQAPVTIVYESNNRPSDIPERFSGSSGTTVLTISGVQAE
DEADYYCGNADSSSGIFGSGTKVTVL

15 SEQ ID NO: 67 (Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
20 CSVMHEALHNHYTQKSLSPGK

SEQ ID NO: 68 (Secuencia de aminoácidos de la región constante lambda de la cadena ligera)

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPE
QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

25

SEQ ID NO: 69 (Secuencia de ADN de V_H de [12819.15384] humanizado)

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTGGATCCCTGCGACTGAGCT
GCGCGCTTCTGGATTCACCTTACAAGATAACGACATGGTGTTGGTCCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGA
GTGGGTGGCTGGTATCGCGATAGTAACAAAGATGACCCGCTACGCACCTGCCGTCAAAGGGAGGGCAACAATT
30 AGTCGGGACAACCAAAGAACATACTCTGTATCTGCAGATGAATTCCCTCGCAGCTGAGGATACAGCAGTGTACTAT
TGTGCCAAAGGTAGCTGCATGCCCTGTTGGAGCAAGCTGGCGTATTGATGCATGGGGACAGGGGACTCTGG
TGACCGTCTCGAG

SEQ ID NO: 70 (Secuencia de ADN de V_L de [12819.15384] humanizado)

35 GCTAGCCTCTTACGAGGCTGACTCAGGACCCCTGCAGTGAGTGTGCCCCGGCCAGACAGTGAGAATCACTTGC
TCCGGCGGAGGGAGCTACGATGGTCCAGCTACTATGGCTGGTATCAGCAGAACCCAGGACAGGCACCTGTGA
CCGTATCTATAACAATAACAATAGGCCATCTGACATTCCCGATCGGTTAGTGGATCTAGTTCAAGGGAACACAG
CTTCTGACCATTACAGGAGCCAGGCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGTGGGTACACGACAGGCCAGAA
ACAAATTCCGATTATGTGGGAATGTTGGTAGCGGCACTAAAGTCACCGTCCTAGG

40

SEQ ID NO: 71 (Secuencia de ADN de V_H de [12748.15381] y [12748.16124] humanizado)

45 GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAGCGGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTGGATCTCTGCGACTGAGTT
GCGCGCTTCAAGGCTTCACATTTCTGACTACGCCATGAACCTGGGTGAGGCAGGCTCTGGCAAGGGACTGGA
GTGGGTGCGAGGAATCGGGAACGATGGAAGTTACACTAATTATGGAGCAGCCGTGAAGGGAGAGCTACTATTT
CCCGCGACAACAGAAAAATACCCCTGTACCTGCAGATGAACACTGAGAGCTGAAGATAACCGCAGTGTACTAT

TGTGCCTCTGACATCAGGAGTCGGAATGATTGCTCCTATTCCTGGAGGGTGTCCAGCGGCTTATTGACGT
GTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACAGTCTCGAG

SEQ ID NO: 72 (Secuencia de ADN de V_L de [12748.15381] humanizado)

5 GCTAGCCTTACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTGCCCTGGGCCAGACAGTGAGAATCACTTGC
TCGGCGGATCCAGCTACAGCTATGGGTGGTCCAGCAGAACGCCGGTCAGGCCCTGTGACCGTCATCTATG
AAAGTAACAATAGGCCATCAGACATTCCCAGTGGTTCTGGCTCTAGTTAGGAAACACAGCTAGTCTGACCA
TCACAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGCAATGCAGATTCCAGCTCTGGAATTTGGG
TCCGGTACTAAAGTCACCGTCCCTAGG

10

SEQ ID NO: 73 (Secuencia de ADN de V_H de [12865.15377] humanizado)

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGCTGGTCCAGCCAGGTGGATCCCTGCGACTGAGCT
GCGCCGCTCTGGATTGACTTTAGCGATCACGGGATGCAGTGGGTGAGACAGGCACCAGGCAAGGGACTGGA
15 GTACGTGGGTGTCATCGACACCACAGGCCGCTATACATACTATGCACCTGCCGTCAAGGGCAGGGCTACCATTA
GTCGGGACAACACTAAAAACTACACTGTACCTGCAGATGAACCTCTGAGGGCTGAAGATACTGCAGTGTACTATT
GCGCCAAAACACTACCTCGTGGGAGGGTACCTGTGCAATACCGTCGGAAGTATCGATGCTTGGGACAGGGGAC
ACTGGTGAAGTGTCTCGAG

SEQ ID NO: 74 (Secuencia de ADN de V_L de [12865.15377] humanizado)

20 GCTAGCCTCCTACGAGCTGACTCAGGACCCAGCAGTGTGAGCGTCGCCCTGGGCCAGACAGTGAGAATCACTTGC
TCGGCGGAGGGTCCAGCTTACTATGGTTGGTACCAAGCAGAACGCCGGCCAGGCTCTGTGACCGTCATCT
ATGACGATAACAAACAGGCCAAGTGGATTCCCGATCGGTTCTCAGGTAGTTCATCCGGCAATACAGCTCTCTGA
CCATCACAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCAGATTACTATTGTGGTGGCTATGAAGGAAGCTCTCACGCCGG
GATTTTGGAAAGTGGACTAAAGTCACCGTCCCTAGG

25

SEQ ID NO: 75 (Secuencia de ADN de V_H de [12892.15378] humanizado)

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAGTGGAGGAGACTGGTCCAGCCAGGTGGAGGCCTGAGACTGTCTT
GCGCCGCTAGTGGCTCGACTTTCCAGCTACACCATGCAGTGGGTGAGGCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGA
30 GTGGGTGGCGTCATCTCTAGTACTGGAGGGTCTACCGGATACGGGCTGCTGTGAAGGGAAAGGGCAACAATT
TCACGGGATAACTCCAAAATACTCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAAGACACAGCCGTACTA
TTGCGTGAATCAATCTCCGGAGATGCCTGGCTGTGGACGGGCTGGATGCTTGGGTCAGGGCACCCCTGGC
ACAGTCTCGAG

SEQ ID NO: 76 (Secuencia de ADN de V_L de [12892.15378] humanizado)

35 GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTGCCCTGGACAGACAGTGAGAATCACTTGC
TCGGAGGAGGATCCGCTACGGTTGGTATCAGCAGAACGCCGGCCAGGCACCTGTGACCGTCATCTACTATA
ACAATCAGAGGCCATCTGGCATTCCCGACCGGTTAGTGGATCCAGCTCTGGAAACACAGCAAGTCTGACCATC
ACAGGCCAGGCTGAGGACGAAGCCGATTACTATTGTGGAAAGCTATGATAGTCAGCTGTGGGATTTTGG
TCTGGCACTAAAGTCACCGTCCCTAGG

40

SEQ ID NO: 77 (Secuencia de ADN de V_H de [12796.15376] humanizado)

GGCGCGCCGAGGTGCAGCTGCTGGAAGTGGAGGAGACTGGTCCAGCCAGGTGGAGGCCTGAGACTGTCTT
GCGCCGCTAGTGGCTCGACTTTCCAGCTACACCATGCAGTGGGTGAGGCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGA
45 GTGGGTGGCGTCATCTCTAGTACTGGAGGGTCTACCGGATACGGGCTGCTGTGAAGGGAAAGGGCAACAATT
TCACGGGATAACTCCAAAATACTCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCAGAAGACACAGCCGTACTA
TTGCGTGAATCAAGTCTCCGGAGATGCCTGGCTGTGGACGGGCTGGATGCTTGGGTCAGGGCACCCCTGGC
ACAGTCTCGAG

SEQ ID NO: 78 (Secuencia de ADN de V_L de [12796.15376] humanizado)

5 GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGCCAGACAGTGAGAATCACTTGC
 TCCGGAGGAGGATCCGCCTACGGTTGGTATCAGCAGAACGCCGGCAGGCACCTGTGACCGTCATCTACTATA
 ACAATCAGAGGCCATCTGACATCCCAGTCGGTTCACTGTGAGGACAGCCATTACTATTGTGGAAGCTATGATAGTTCAGCTGTGGGATTTGG
 TTCTGGCACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 79 (Secuencia de ADN de V_H de [12777.15382] humanizado)

10 GGC CGCC GAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTGGAAGCCTGCGACTGTCTT
 GCGCCGCTAGTGGATTCGACTTTCCAGCTACGGAATGCAGTGGGTGAGGCAGGCACCAGGCAAGGGACTGGA
 GTGGGTGGCGTCATCTCTGGAAGTGGGATTACACACTGTACGCACCTGCCGTCAAGGGAAAGGGCTACTATC
 TCACGGGACAACCTCTAAAATACAGTGTATCTGCAGATGAACCTCCCTGAGAGCTGAAGAGATACCGCAGTCTACTAT
 TGTAACACGCTCACCCCTCCATCACAGACGGCTGGACTTATGGAGGGGCCTGGATTGATGCTTGGGTCAAGGCA
 CTCTGGTACCGTCTCGAG

15 SEQ ID NO: 80 (Secuencia de ADN de V_L de [12777.15382] humanizado)

20 GCTAGCCAGCTACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGCCAGACAGTGAGAATCACTTGC
 AGTGGCGGAGATGGGTCAACGGTTGGTCCAGCAGAACGCCGGACAGGCCCTGTGACCGTCATCTATGACA
 ACGATAATAGGCCATCTGACATCCCAGTCGGTTAGTGGCTCAGCTCTGAAACACAGCTCTCTGACCATCA
 CAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGAATGCAGACCTGTCCGGGGTATTTCCGGCAG
 CGGAACCTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 81 (Secuencia de ADN de V_H de [12760.15375] humanizado)

25 GGC CGCC GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTGGATCCCTGAGACTGAGCT
 GCGCCGCTCTGGATTCACCTTACATTCAACATGGTGTGGGTCAAGGCACCTGGAAAGGGACTGGA
 GTACGTGGCTGAAATCTCCAGCGACGGCTCTTACATGGTATGCAACTGCCGTCAAGGGCAGGGCACCATT
 GTCGGGATAACTCAAAAATACAGTGTACCTGCAGATGAATTCCCTGAGGGCTGAGGACACCGCAGTCTACTAT
 TGCGCAAATCCGATTGTTCTAGTTACATATGGATATAGCTGTATCGGGATCATTGACGCTTGGGTCAAGGG
 ACTCTGGTACCGTCTCGAG

30 SEQ ID NO: 82 (Secuencia de ADN de V_L de [12760.15375] humanizado)

35 GCTAGCCTCTATGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGAAGCGTCGCCCTGGGCCAGACAGTGAGAATCACTTGC
 TCCGGCGGAATTAGCGACGATGGCTCTTACTATTACGGATGGTCCAGCAGAACGCCGGACAGGCCCTGTGA
 CCGTCATCTATATTACGACAGGGGCCAGTAATATCCCCGATAGGTTTCAGGGTCCAGCTCTGGTAACACA
 GCTTCTCTGACCATTACAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTATTACTGTGGCTCTACGATAGTTCAGC
 AGGGTGGTATCTCGGCAGTGGAACTAAAGTCACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 83 (Secuencia de ADN de V_H de [13112.15380] humanizado)

40 GGC CGCC GAGGTGCAGCTGCTGGAAGTGGAGGAGGACTGGTCCAGCCAGGTGGATCACTGAGACTGTCTT
 GCGCCGCCCTCCGGCTTCACCTTCCAGCTACAAACATGTTCTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGA
 GTTTGTGCGTCAAATCTCTGGTAGTAATACTGGAAGCCGAACCTGGTACGCACCTGCCGTGAAGGGCAGGGCTA
 CAATTCTCGGGACAACAGTAAAATACTCTGTATCTGCAGATGAACCTCTCTGAGGGCTGAGGATACAGCAGTGT
 ACTATTGTGCAAATCAATCTACGGAGGGTATTGCGCCGGTGGCTATTCTGTGGTGTGGCCTGATTGACGCA
 TGGGGACAGGGGACCCCTGGTCACAGTCTCGAG

45 SEQ ID NO: 84 (Secuencia de ADN de V_L de [13112.15380] humanizado)

50 GCTAGCCTCATACGAGCTGACCCAGGACCCAGCAGTGTCCGTCGCCCTGGGCCAGACAGTGAGAATCACTTGC
 AGTGGCGGATCCAGCGATTACTATGGGTGGTCCAGCAGAACGCCGGTCAGGCCCTGTGACCGTCATCTACT
 ATAACAACAAGAGGCCATCTGACATCCCAGTCGGTTAGTGGCTCTAGTTCAAGGAAACACAGCCTCCCTGACC
 ATTACAGGGGCCAGGCTGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGAATGCAGACTCCAGCGTGGGAGTCTTCG
 GGTCTGGTACTAAGGTGACCGTCCTAGG

SEQ ID NO: 85 (Secuencia de ADN de V_L de [12748.16124] (línea germinal alternativa))

5 GCTAGCCTTACGAGCTGACTCAGCCACCTTCCGTGCCGTCCCCAGGACAGACCGCAAGAACATCACATGCA
GTGGCGGATCCAGCTACTCATATGGGTGGTCCAGCAGAAGCTGGTCAGGCCCCCTGACAGTCATCTATGA
GAGCAACAATAGGCCTCTGACATTCCAGAACGGTTAGTGGCTCTAGTTAGGAACCACAGTGACTCTGACCAT
CAGCGGGGTCCAGGCCGAGGACGAAGCTGATTACTATTGTGGAACCGCTGATTCCAGCTCTGGAATTTCGGGT
CCGGTACAAAAGTGAAGTGTCTTAGG

SEQ ID NO: 86 (Secuencia de ADN genómico de la región constante de cadena pesada con intrones incluidos)

10	CTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGCTGGCTGAAGGACTACTTCCCAGACCGGTGACGGTGTCGGAACTCAGGCCTG ACCAGCGCGTGCACACCTCCGGCTGCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCGAACGTGAATACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTTGGTGAAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCGCTCTGCCT
15	GGACGCATCCCGGCTATGCAGTCCCAGTCCAGGGCAGCAAGGCAGGCCCGTCTGCTCTTACCCGGAGGC CTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTGGCTTTTCCCCAGGCTCTGGGAGGCACAGGCT AGGTGCCCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGGGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCG GGAGGACCTGCCCCCTGACCTAACGCCCACCCCCAAGGCCAAACTCTCACTCCCTCAGCTGGACACCTCTCT CCTCCAGATTCCAGTAACCTCAAATCTTCTCTGCAGAGCCAAATCTTGACAAAACACTCACACATGCCAC
20	CGTCCCCAGGTAAGCCAGGCCAGGCCCTGCCCTCCAGCTAACGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCTGCA TCCAGGGACAGGCCAGGCCCTGCCGGGTGCTGACACGTTAACCTCCATCTTCTCTGCACCTGAAAGccggGGGG ACCGTCAGTCTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAC
25	CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAA CCATCTCAAAGCCAAAGGTGGACCCGTGGGTGCGAGGGCCACATGGACAGAGGCCGGCTGGCCCACCC TCTGCCCTGAGAGTGACCGCTGTACCAACCTCTGTCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAACCTGACCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAGCCTCCGTGCTGGA
30	CTCCGACGGCTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGGCCTCTCCGTCCCCGGGAAATGA

SEQ ID NO: 87 (Secuencia de ADNc de la región constante de cadena pesada)

35	CTCGAGTGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGCTGCCTGGTAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCCTG ACCAGCGCGTGACACCTTCCGGCTGCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTGGCACCCAGACCTACATCGAACGTGAATACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTTGAGCCAAATCTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCCCAGCACCTGAAggccgggggg ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAGGGACACCCCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCG
40	TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAA CCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAAGGTCACTGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGTTCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGC
45	AATGGGCAAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTCTATAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAAGTCTCTCATGCTCCGTATGCGATGAGGCTCTG CACAAACCACTACACGCCAGAACAGGCTCTCCCTGCCCCGGTAAATGA

SEQ ID NO: 88 (Secuencia de ADN de la región constante lambda de cadena ligera)

50 CCTAGGTCAGCCAAGGCCAACCCACTGTCACCTGTTCCCAGCCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACAAG
GCCACACTAGTGTGCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCTGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCC
CCGTCAAGGCCGGAGTGGAGACCACCAACCTCAAACAGAGCAACAACAAGTACGCCAGCAGCAGCTACCT
GAGCCTGACGCCAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACCGCATGAAGGGAGCACCGT
GGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTATAA

ES 2 924 402 T3

SEQ ID NO: 89 (Polipéptido PD-1 de *Macaca fascicularis*, Acceso NCBI B0LAJ3_MACFA)

MQIPQAPWPV VWAQLQLGWR PGWFLESPDR PWNAPTFSPA LLVTTEGDNA TFTCSFSNAS ESFVLNWYRM
SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTRL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA
ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQALV VGVVGGLLGS LVLLVVVLAV ICSRAAQGTI EARRTGQPLK
5 EDPPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPAP CVPEQTEYAT IVFPSGLGTS SPARRGSADG PRSPRPLRPE
DGHCSWPL

SEQ ID NO: 90 (Polipéptido PD-1 de *Gallus gallus*, Núm. de Acceso NCBI XP_422723.3)

MGKEAPSGTG HRHRAQQGTR RPAMALGTSR TMWDSTEAL VVLCVLLCC NPPLAGCHQV
TLFPATLTRP AGSSATFICN ISMENSSLEF NLNWYQKTNN SNPQKIAGII RNIPQKKMEK
10 YRLFNNTPVF KMEILNLHQN DSGFYCCGLI TFSRSDKVVE SSHSQLVVTE APEKTNTIDE
PSEEEESSPPD HIKAVLLGTL LLAGVIVLLL FGYIIINR ADVQKPSSGN TLAEVKPPVV
PVPTVDYGVL EFQRDPHSQV PLETCPAEQT EYATIVFPEE KPITPERGKR HKDERTWQLP
SQPC

15 SEQ ID NO: 91 (Polipéptido PD-1 de *Mus musculus*, Núm. de Acceso NCBI NP_032824.1)

MWVRQVPWSF TWAQLQLSWQ SGWLLEVPNG PWRSLTYPW WLTSEGANA TFTCSLSNWS
EDMLNWNRL SPSNQTEKQA AFCNGLSQPV QDARFQIIQL PNRHDFHMNI LDTRRNDSGI
YLCGAISLHP KAKIEESPGA ELVTERILE TSTRYPSPSP KPEGRFQGMV IGIMSLVGI
PVLLLLAWAL AVFCSTMSE ARGAGSKDDT LKEEPAAPV PSVAYEELDF QGREKTPELP
20 TACVHTEYAT IVFTEGLGAS AMGRRGSADG LQGPRPRHE DGHCSWPL

SEQ ID NO: 92 (Polipéptido PD-1 de *Rattus norvegicus*, Núm. de Acceso NCBI XP_006245633.1)

MWVRQVPWSF TWAQLQLSWQ SGWLLEVPNG PWRSLTYPW WLTSEGANA TFTCSLSNWS
25 EDMLNWNRL SPSNQTEKQA AFCNGLSQPV QDARFQIIQL PNRHDFHMNI LDTRRNDSGI
YLCGAISLHP KAKIEESPGA ELVTERILE TSTRYPSPSP KPEGRFQGMV IGIMSLVGI
PVLLLLAWAL AVFCSTMSE ARGAGSKDDT LKEEPAAPV PSVAYEELDF QGREKTPELP
TACVHTEYAT IVFTEGLGAS AMGRRGSADG LQGPRPRHE DGHCSWPL

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo, que se unen a un epítopo en PD-1 humana que comprende los restos de aminoácido V64, L128, P130, K131 y A132 de SEQ ID NO: 1.
2. El anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende H-CDR1-3 y L-CDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18-20 y de SEQ ID NO: 21-23, respectivamente.
3. El anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3.
4. El anticuerpo anti-PD-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo es una IgG₁, que comprende opcionalmente una mutación en una o ambas de las posiciones de aminoácidos 234 y 235 de la cadena pesada, que se numeran según el esquema de numeración IMGT, opcionalmente en donde uno o ambos de los restos de aminoácido en las posiciones 234 y 235 están mutados a Ala.
5. El anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo o porción tienen al menos una de las siguientes propiedades:
 - a) se unen a PD-1 humana con una K_D de 750 pM o menos;
 - b) se unen a PD-1 de cinomolgo con una K_D de 7 nM o menos;
 - c) se unen a PD-1 de ratón con una K_D de 1 nM o menos;
 - d) no se unen a PD-1 de rata;
 - e) aumentan la secreción de IL-2 en un análisis de sangre completa con SEB;
 - f) aumentan la secreción de IFN- γ en un análisis de reacción mixta linfocitaria unidireccional;
 - g) inhiben la interacción de PD-1 con PD-L1 en al menos 60% a una concentración de 10 μ g/ml en un ensayo competitivo mediante citometría de flujo;
 - h) bloquean la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 en al menos 90% a una concentración de 10 μ g/ml según se determina mediante análisis de interferometría de Bio-Capa; e
 - i) inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*.
6. Un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68.
7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable, que comprende opcionalmente de manera adicional un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un agente antiangiogénico, un inhibidor de tirosina quinasa, o un inhibidor de la ruta PD-1.
8. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, o una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambas, del anticuerpo anti-PD-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
9. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 8, en donde dicho vector comprende adicionalmente una secuencia de control de la expresión.
10. Una célula anfitriona que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, o una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, del anticuerpo anti-PD-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
11. Un método para producir un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende proporcionar una célula anfitriona según la reivindicación 10, cultivar dicha célula anfitriona en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o porción, y aislar el anticuerpo o porción resultantes.
12. Una molécula de unión biespecífica que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo anti-PD-1 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y la especificidad de unión de otro anticuerpo distinto.
13. Un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, una composición farmacéutica según la reivindicación 7, o una molécula de unión biespecífica según la reivindicación 12

para su uso en la mejora de la inmunidad en un paciente que lo necesite.

14. El anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, una composición farmacéutica según la reivindicación 7, o una molécula de unión biespecífica según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente.

5 15. El anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica para el uso de la reivindicación 14, en donde el cáncer se origina en un tejido seleccionado del grupo que consiste en piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas.

10 16. El anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica para el uso de la reivindicación 14, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma avanzado o metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales y linfoma de Hodgkin.

15 17. El anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en donde dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica se administran con un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un agente antiangiogénico, un inhibidor de tirosina quinasa o un inhibidor de la ruta de PD-1.

ES 2 924 402 T3

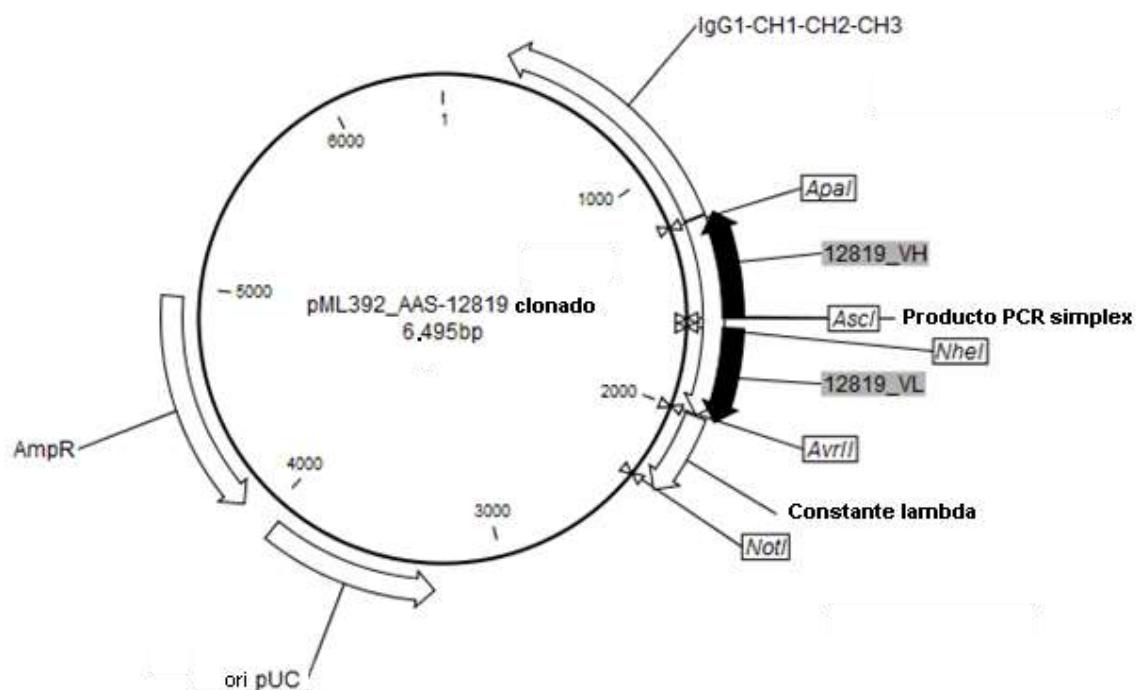


Figura 1

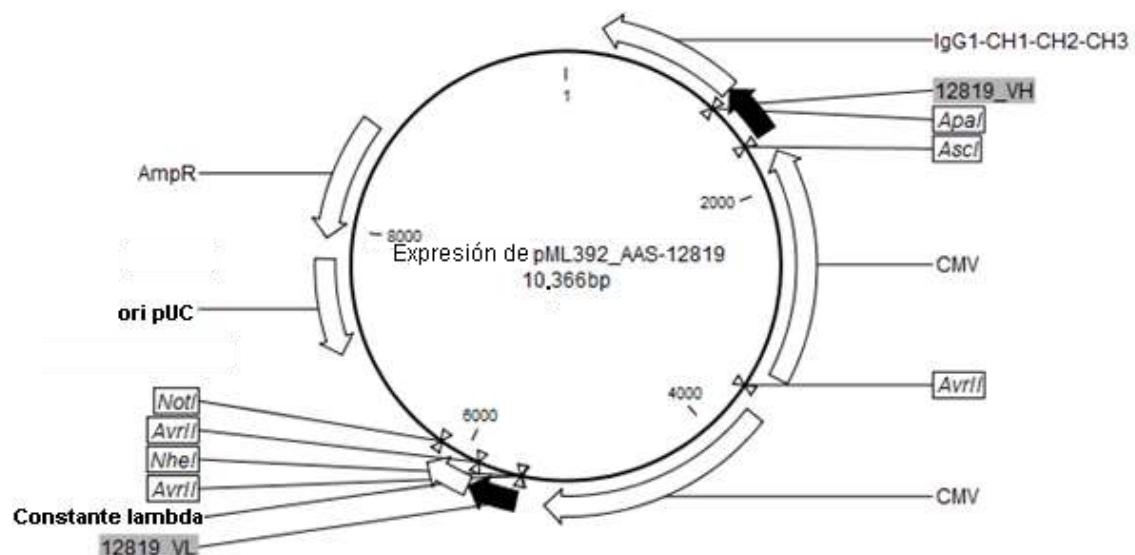


Figura 2

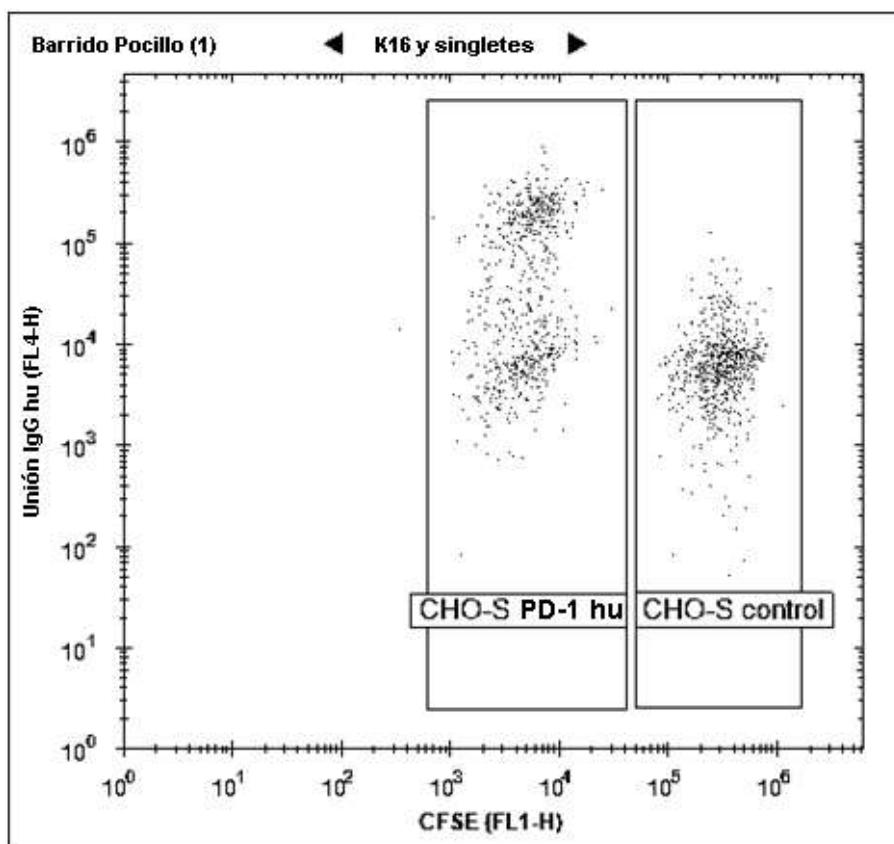


Figura 3A

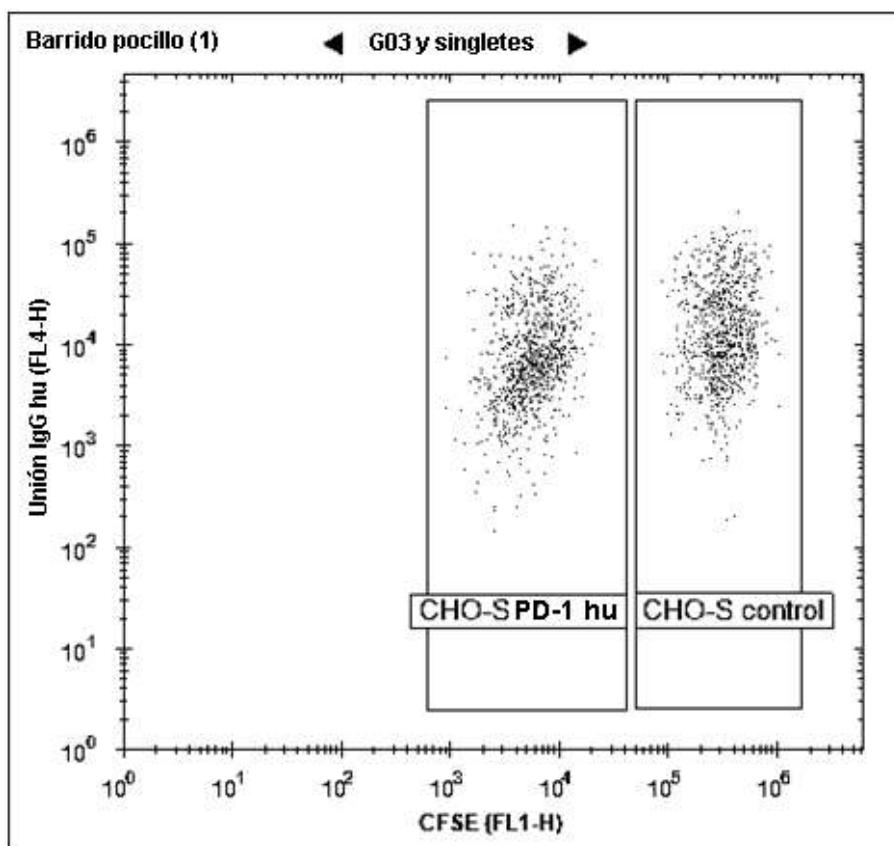


Figura 3B

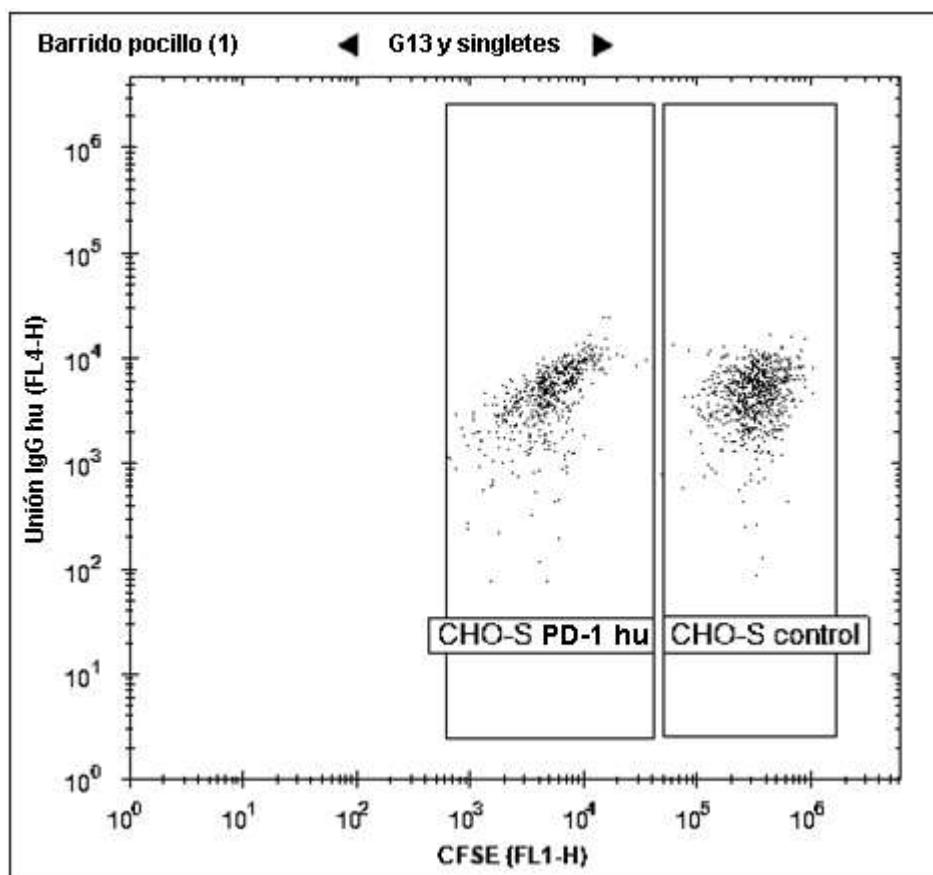


Figura 3C

Figura 4

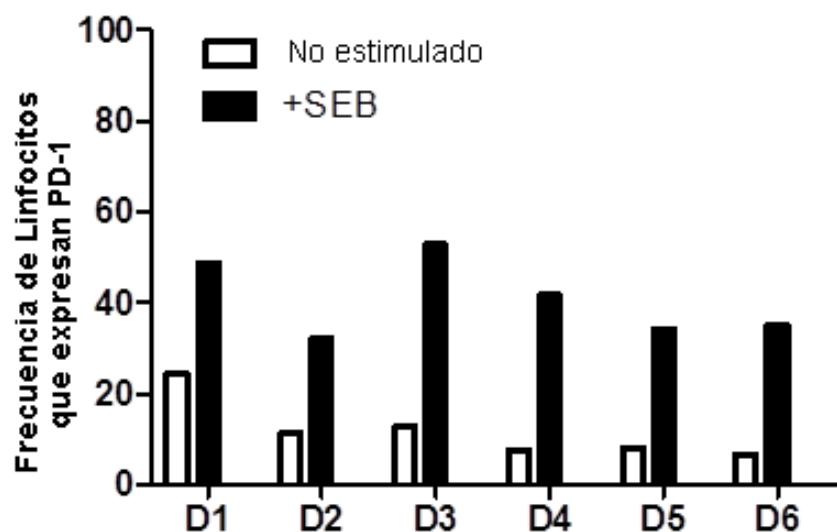


Figura 5A

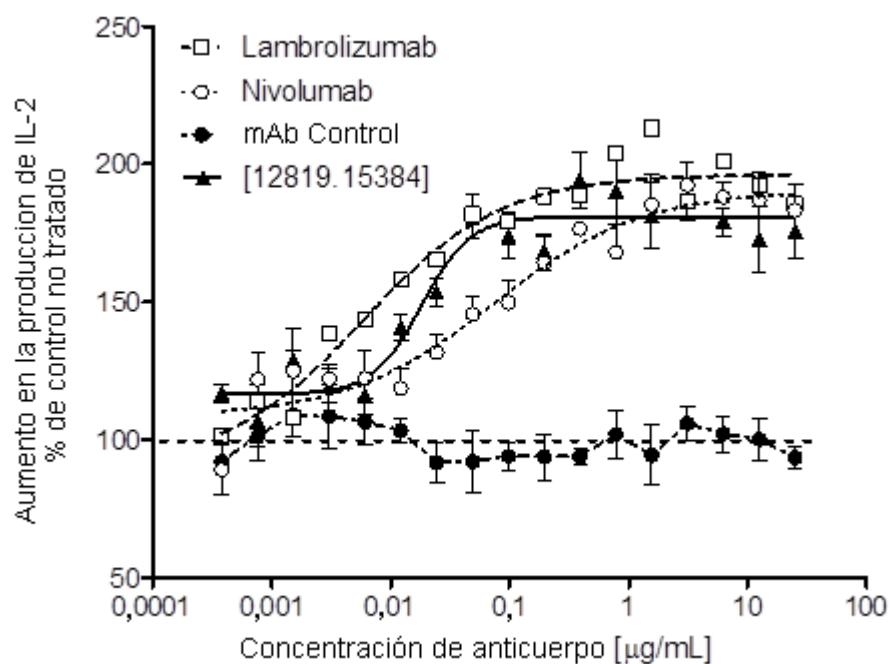


Figura 5B

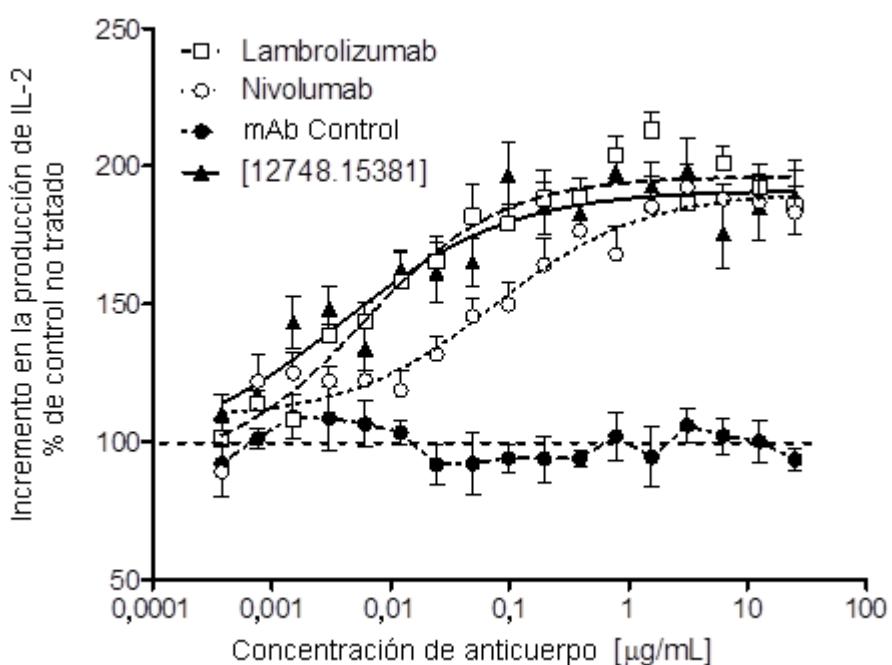


Figura 5C

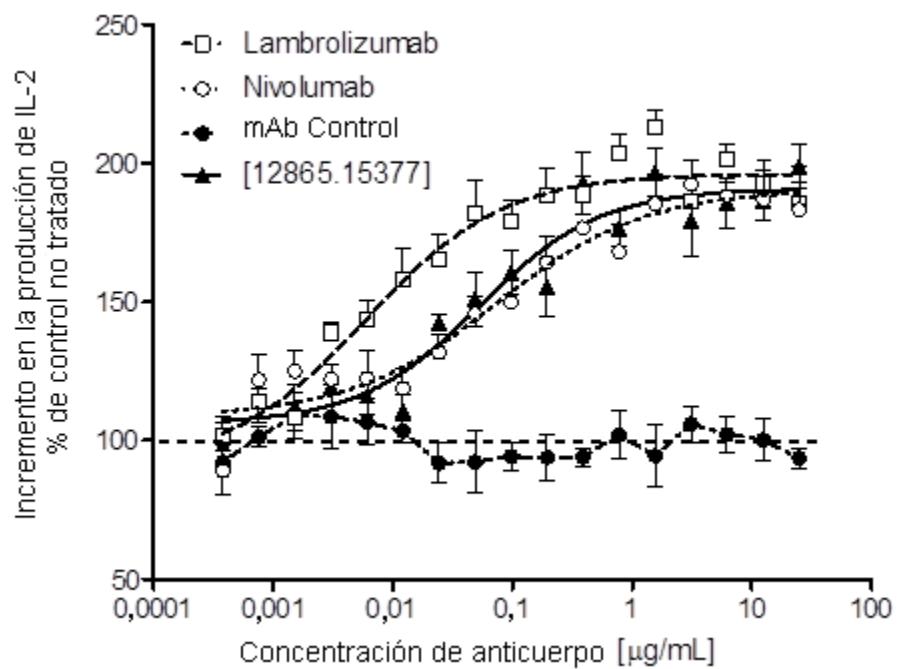


Figura 5D

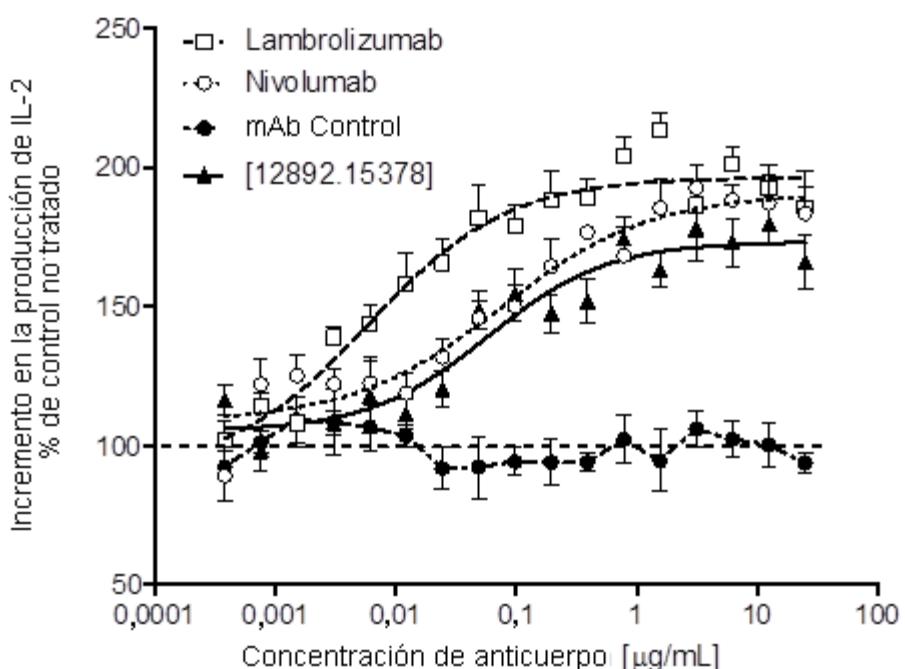


Figura 5E

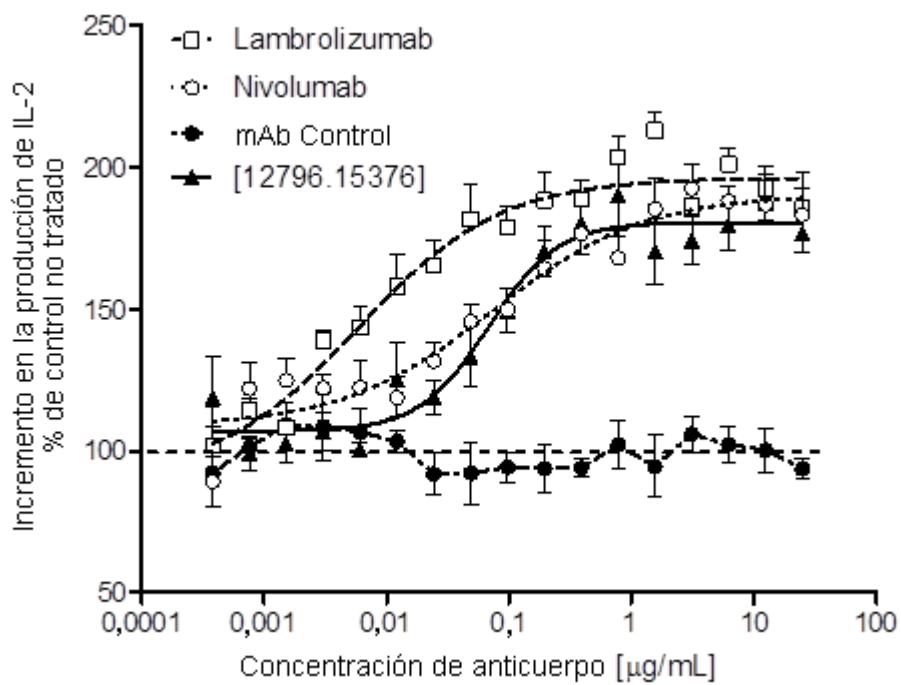


Figura 5F

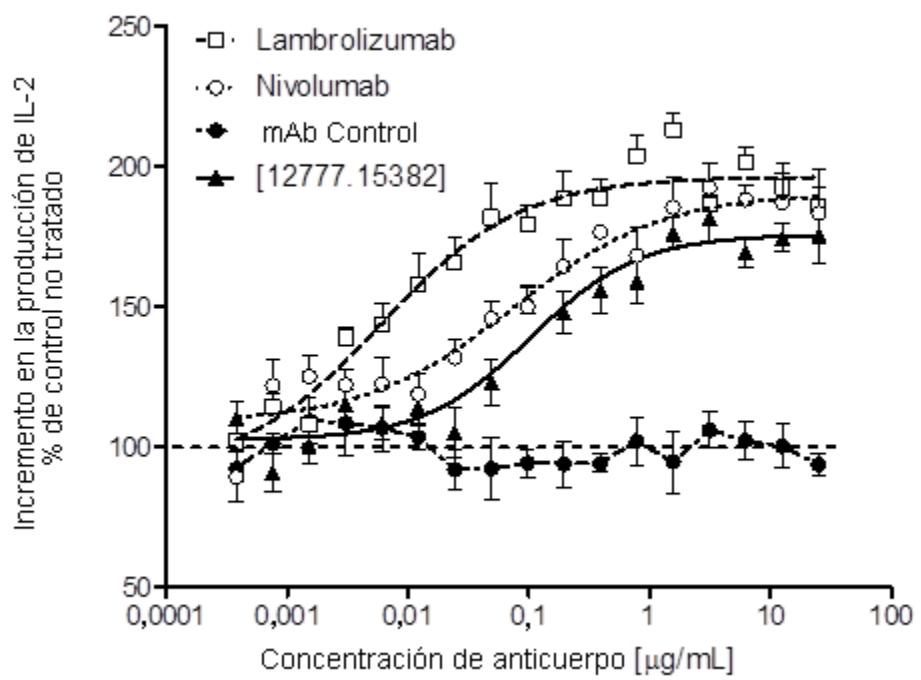


Figura 5G

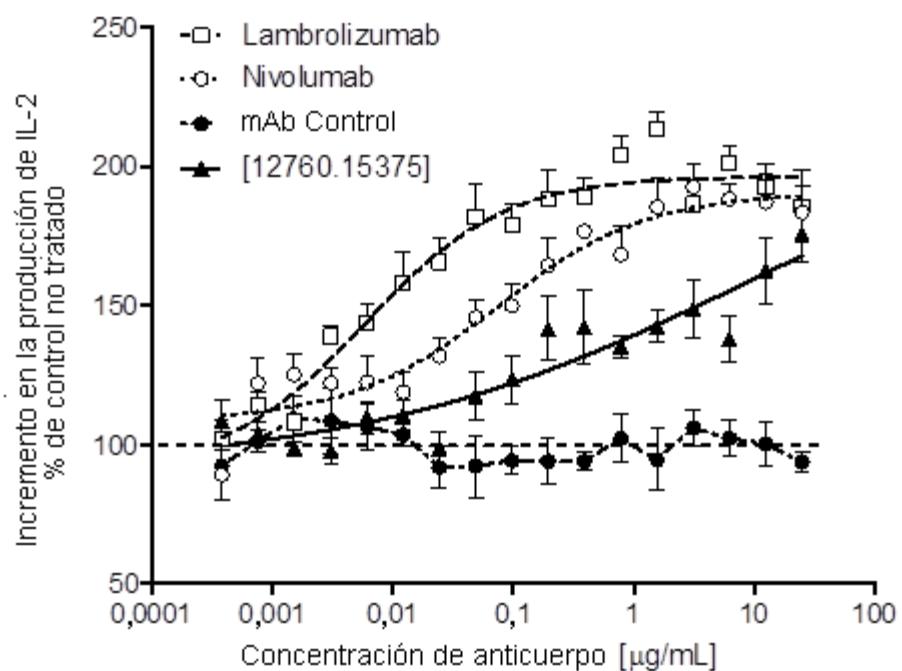


Figura 5H

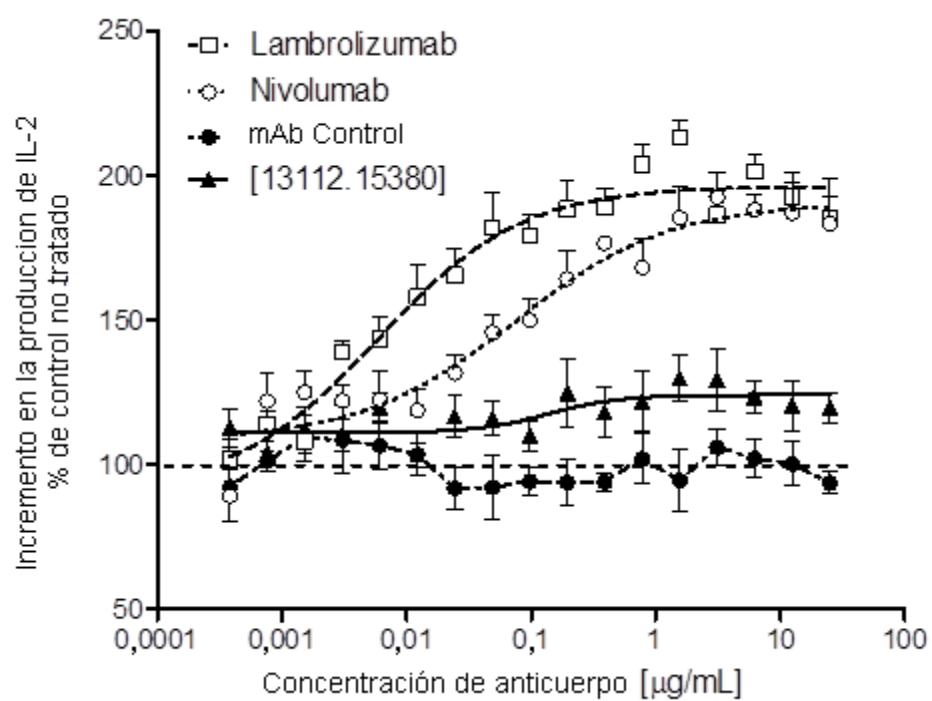


Figura 5

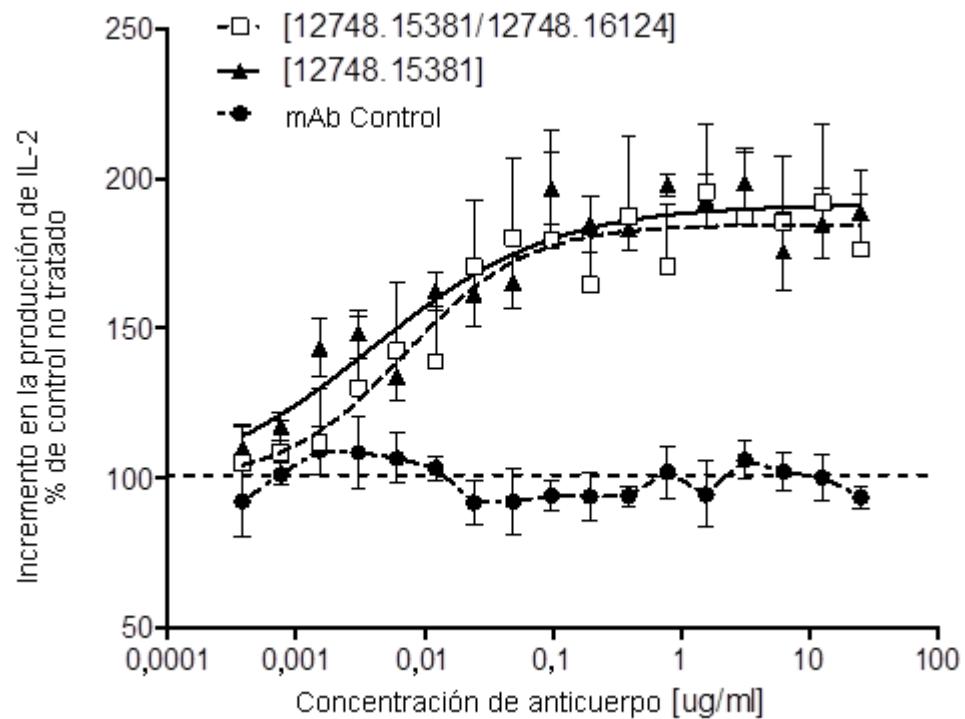


Figura 6A

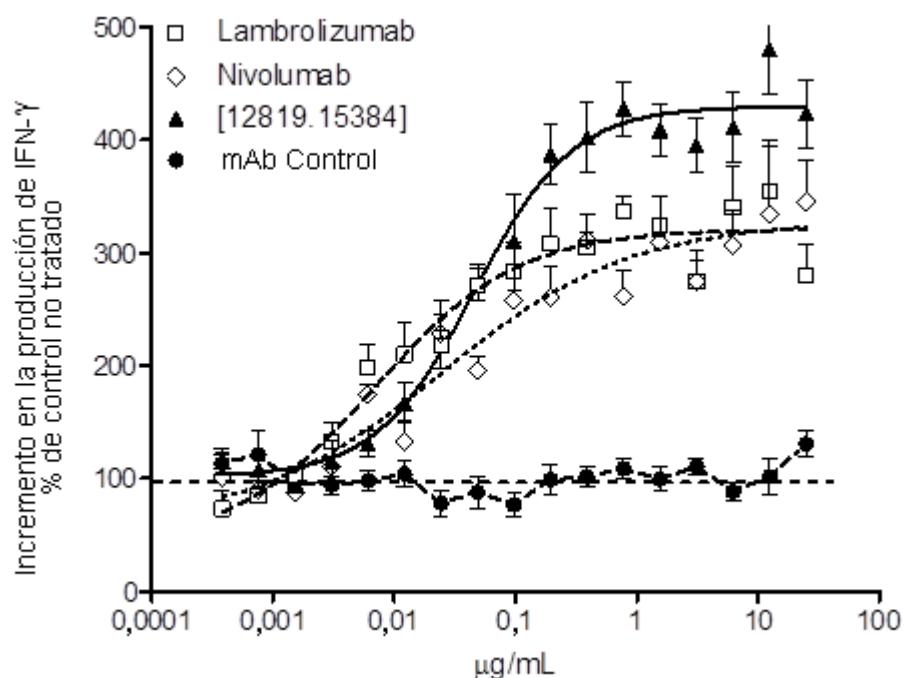


Figura 6B

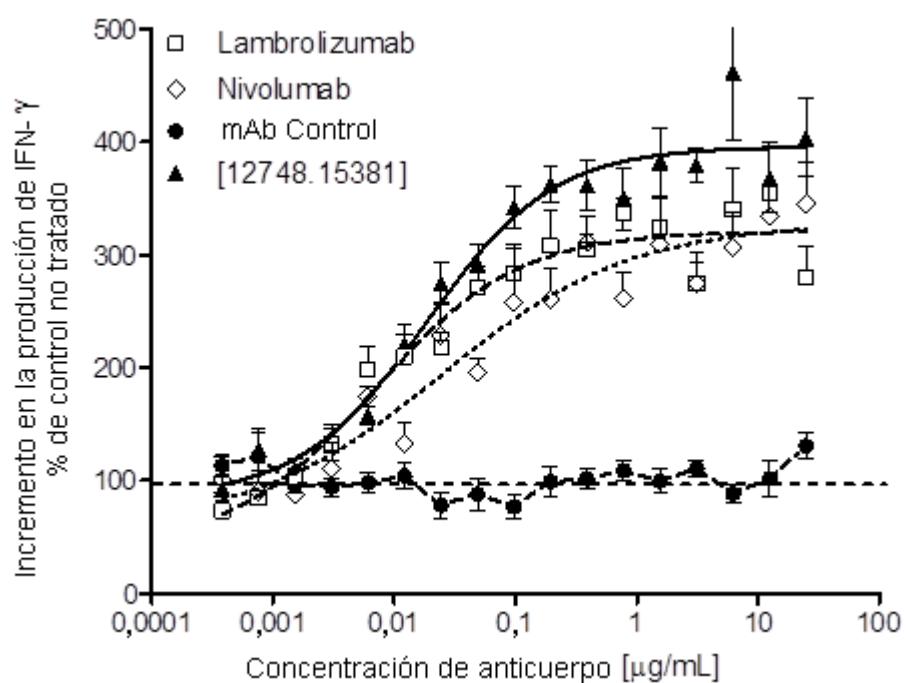


Figura 6C

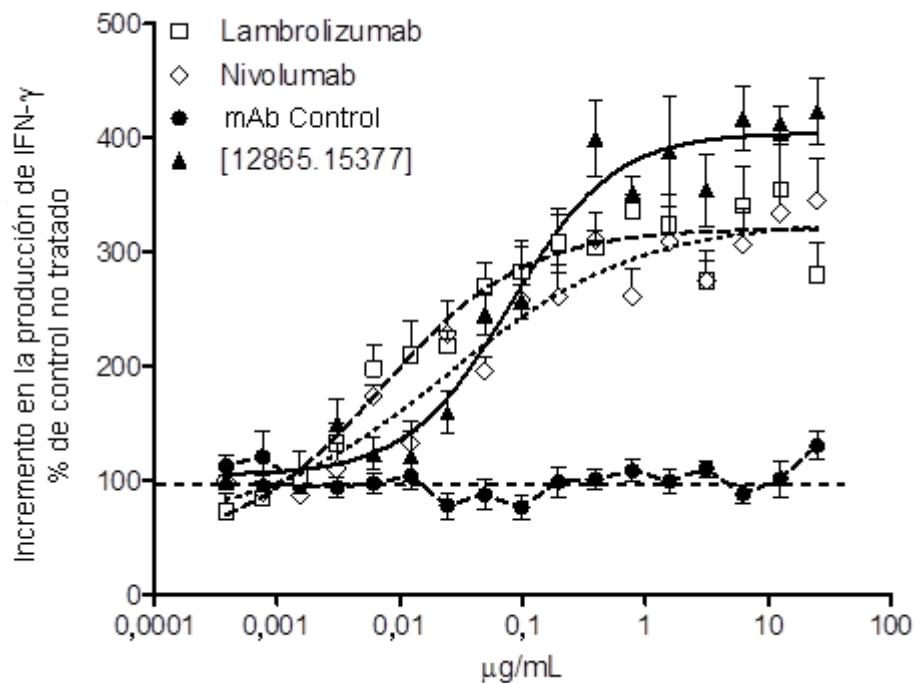


Figura 6D

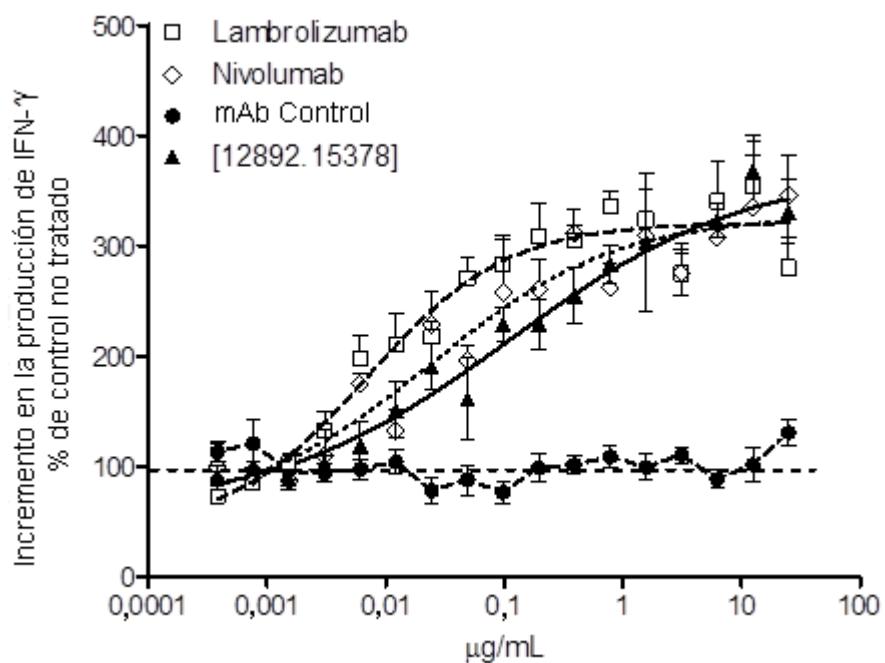


Figura 6E

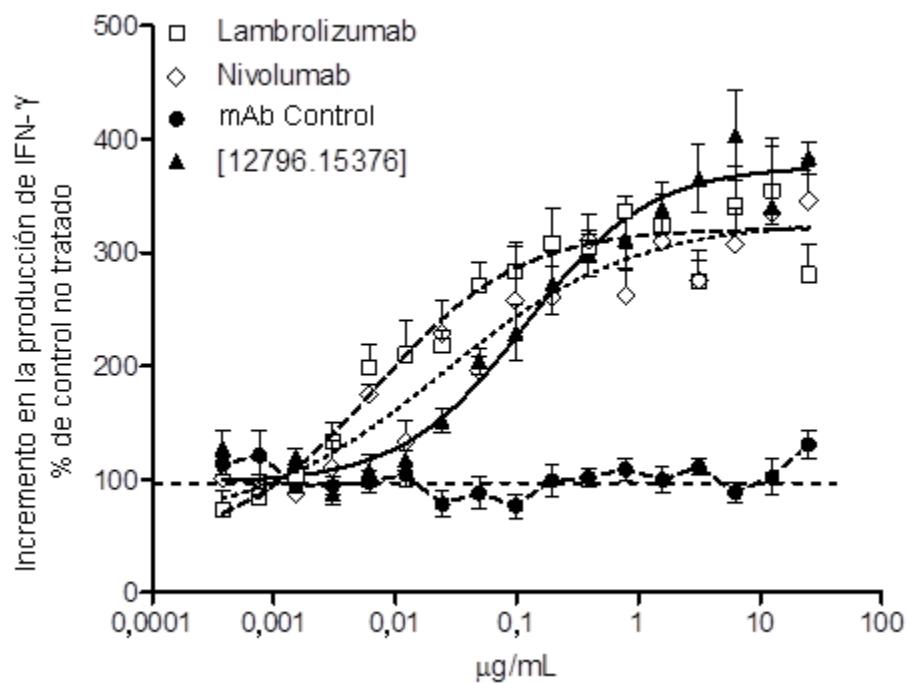


Figura 6F

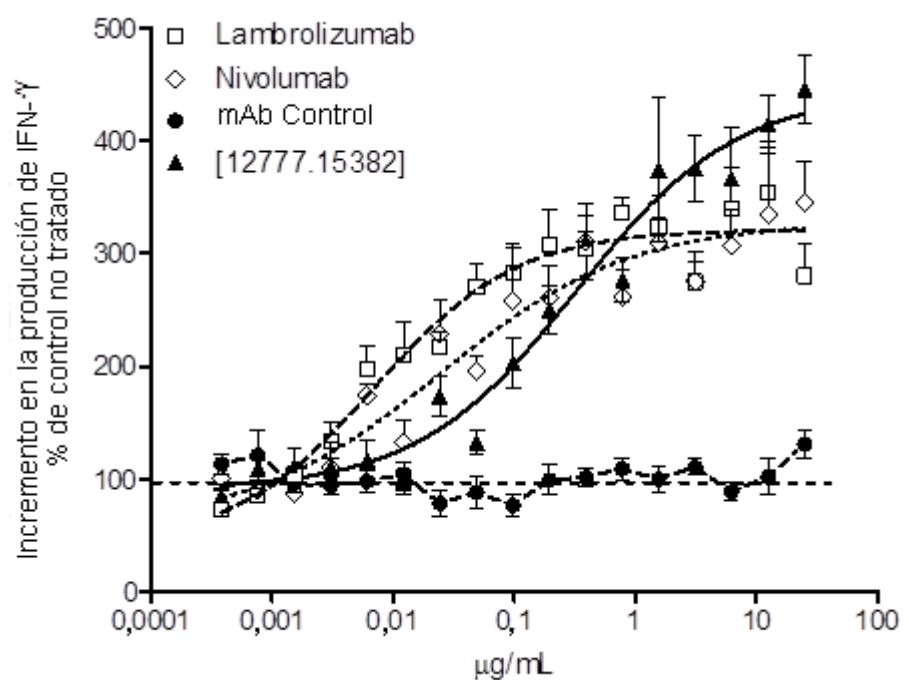


Figura 6G

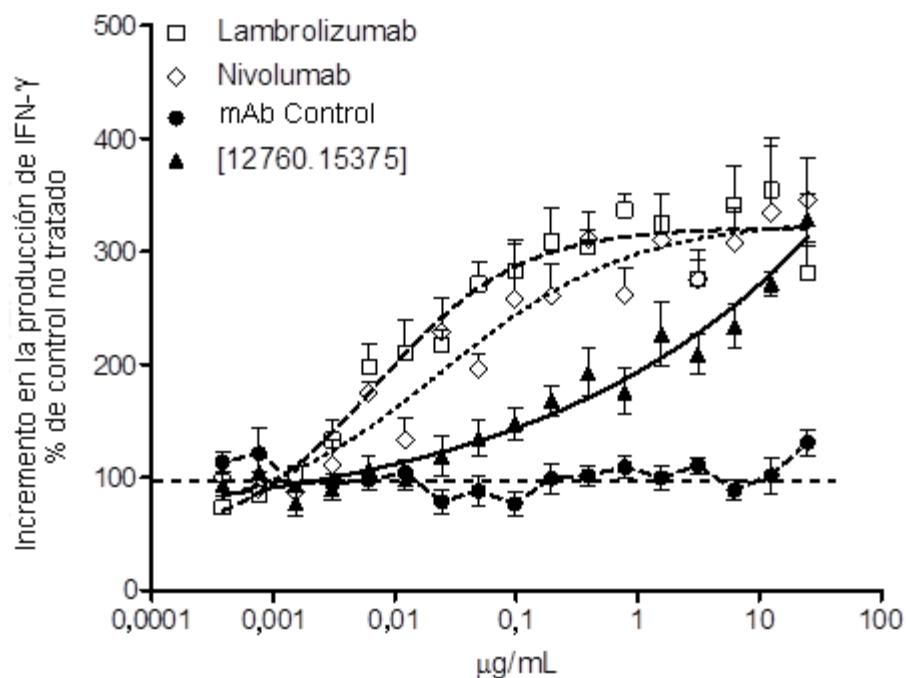


Figura 6H

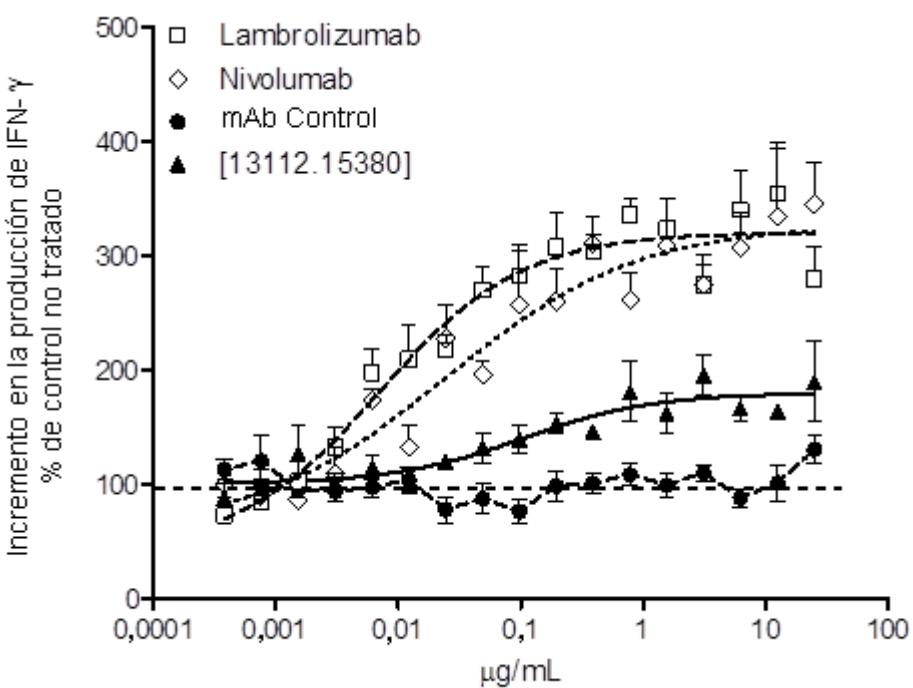


Figura 7A

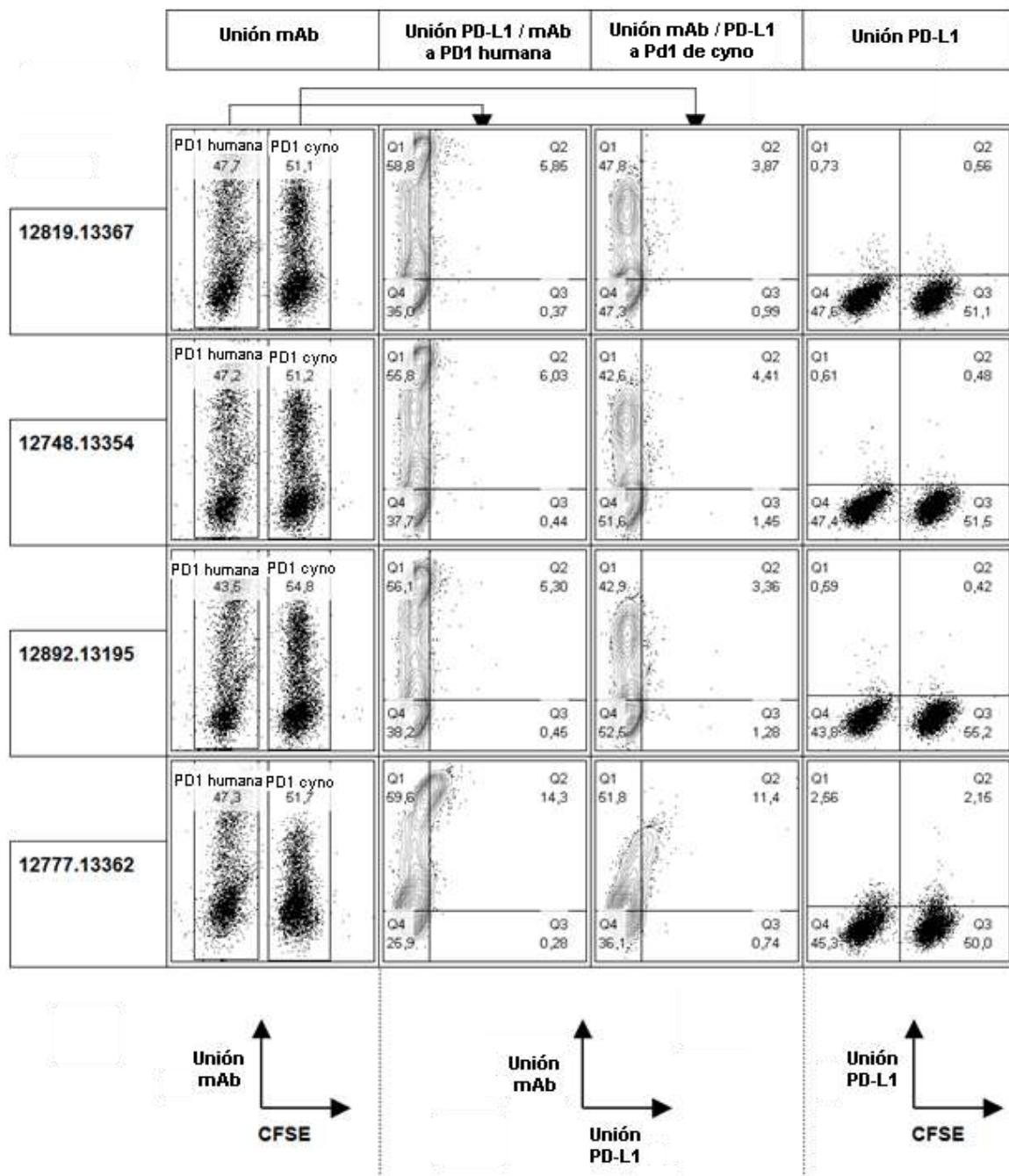


Figura 7B

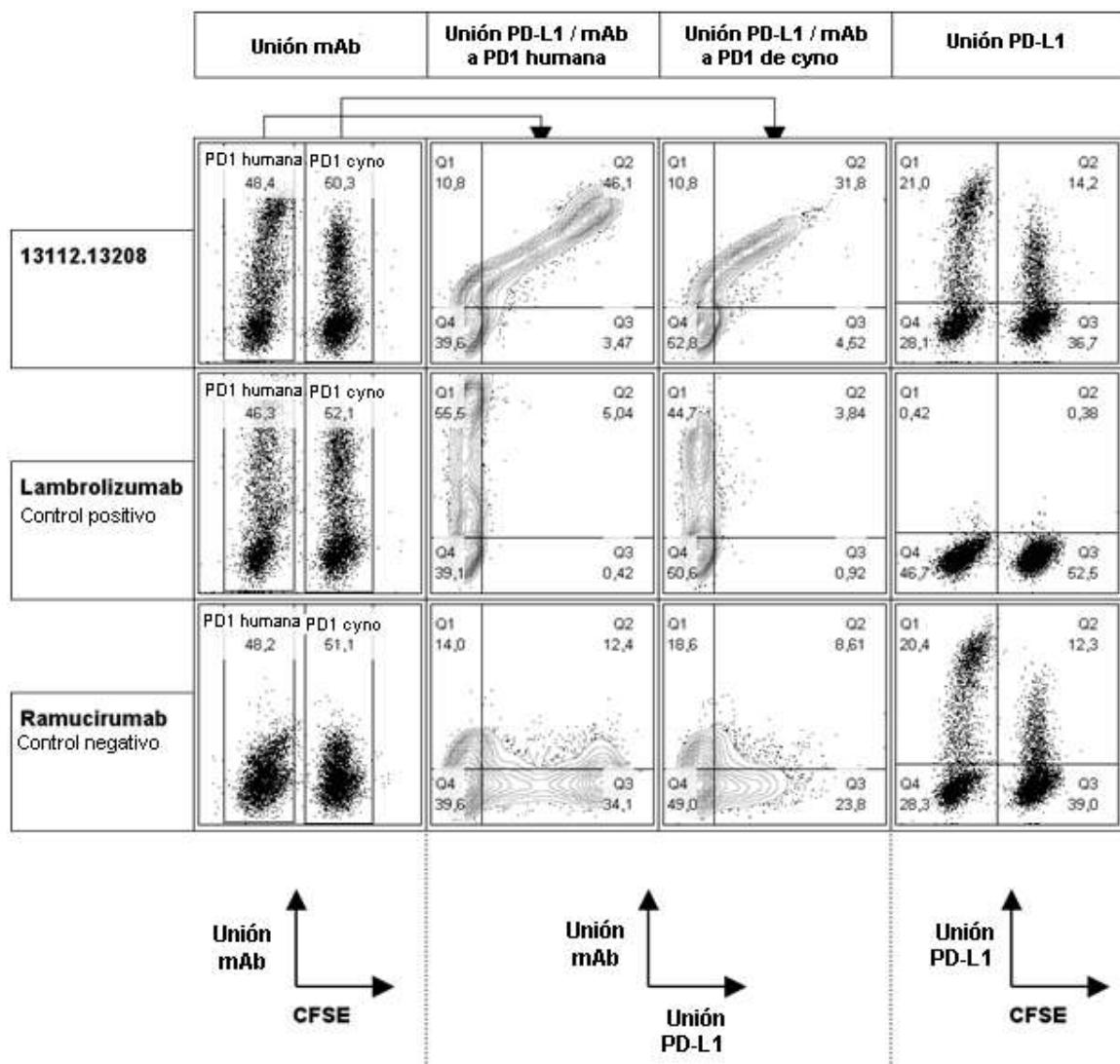


Figura 8

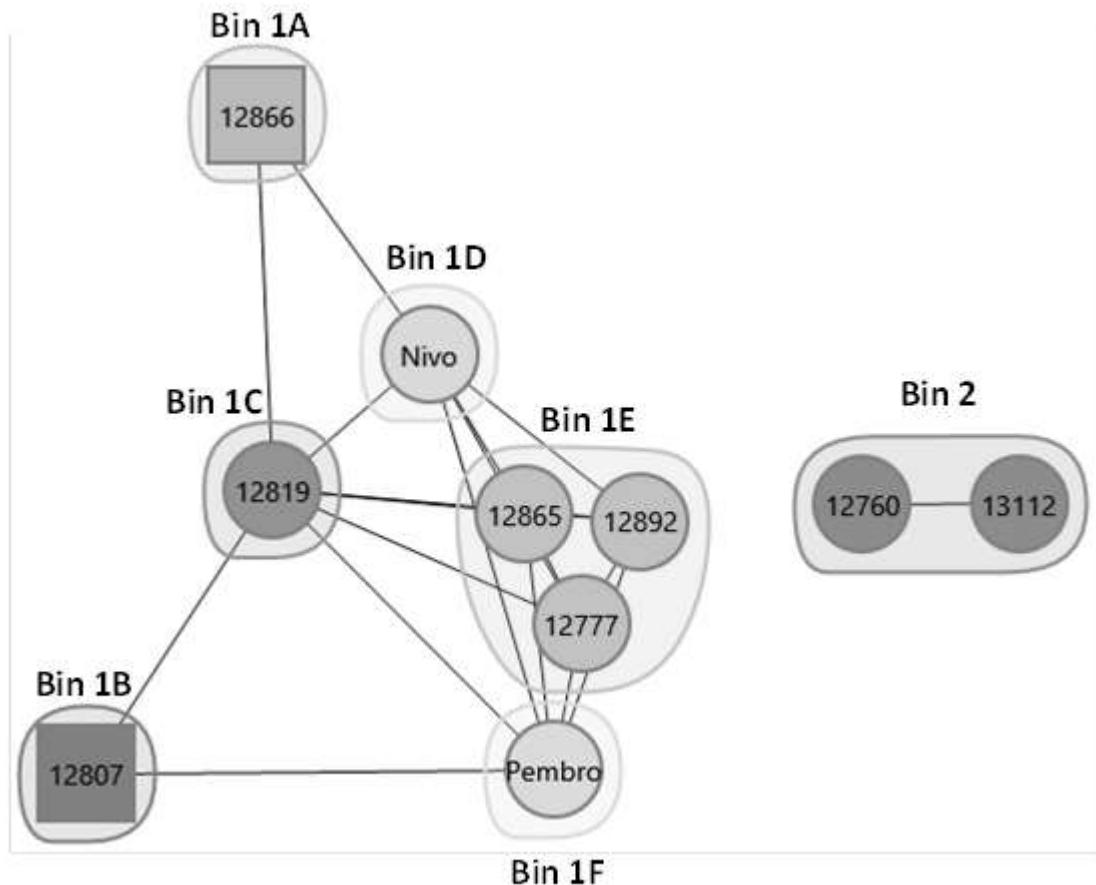


Figura 9

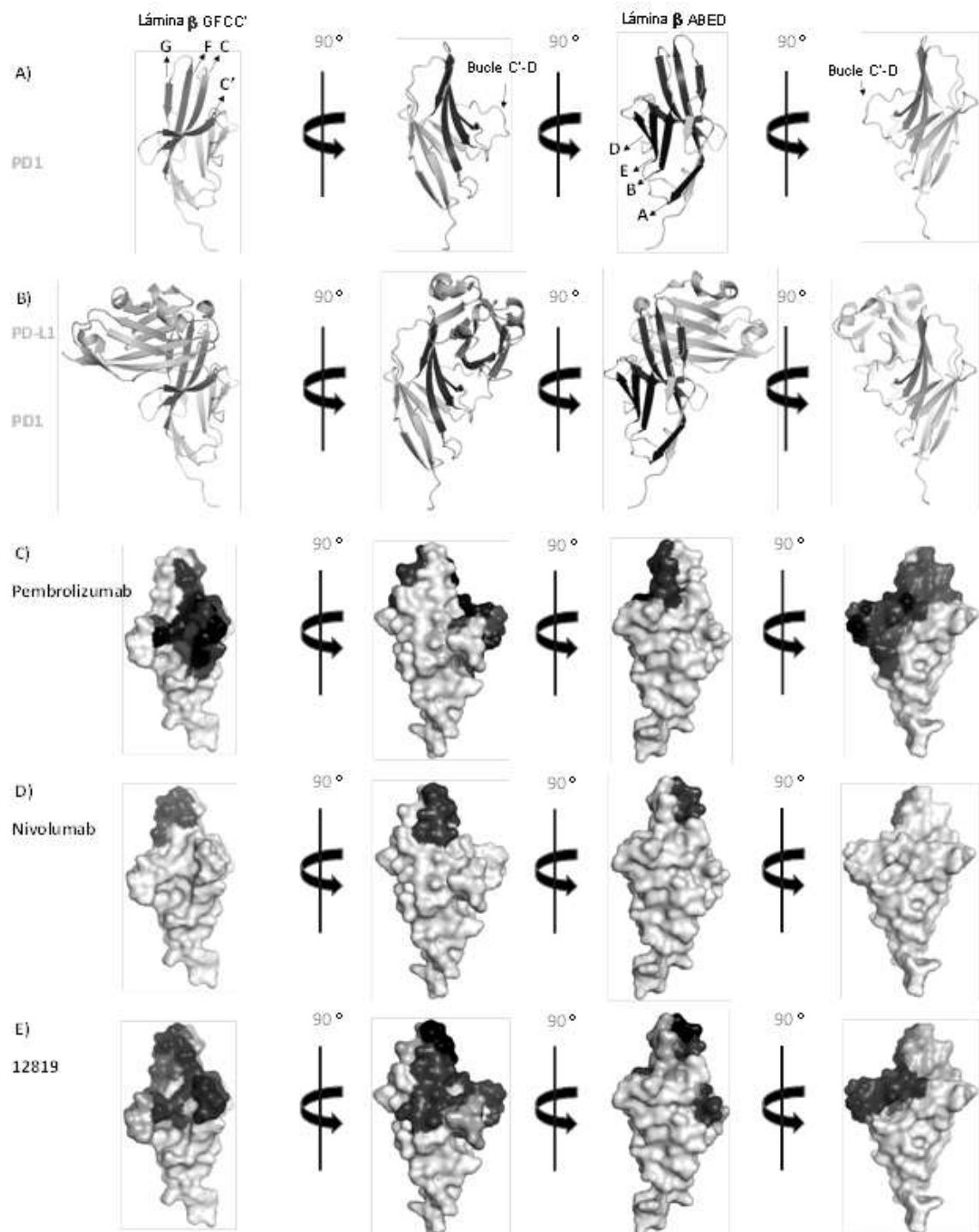


Figura 9 (cont.)

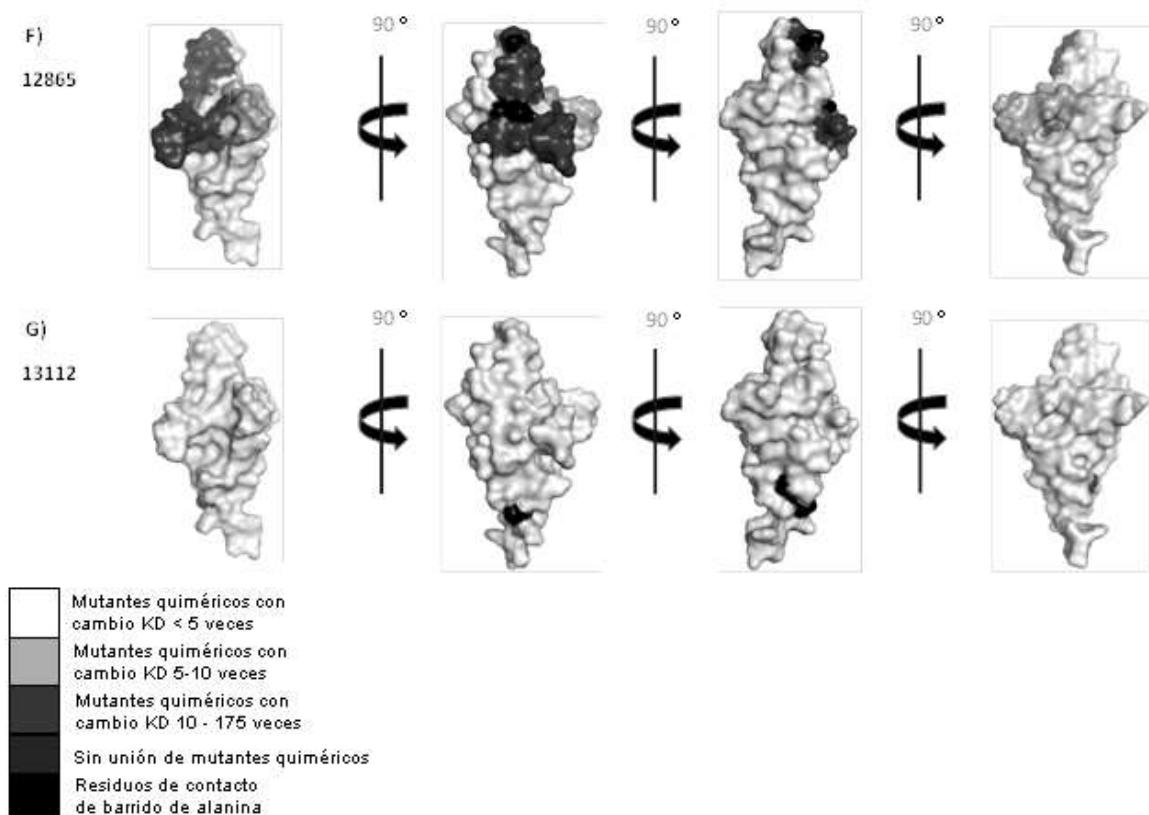


Figura 10

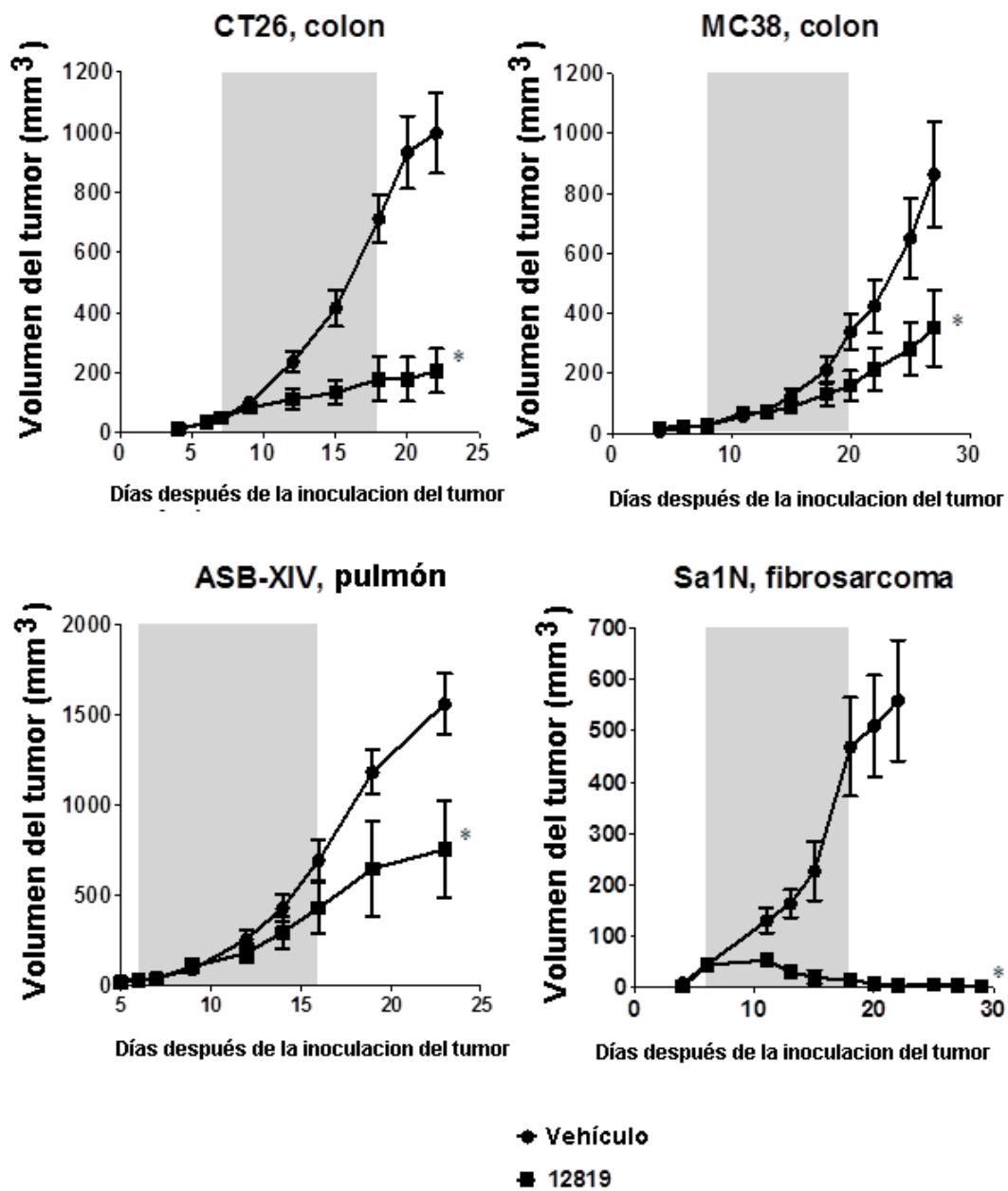


Figura 11

