

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 957**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2016** **PCT/CN2016/099576**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2018** **WO18053709**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2016** **E 16916449 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025** **EP 3515938**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra la proteína de muerte programada 1 (PD-1)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.05.2025

73 Titular/es:

CSTONE PHARMACEUTICALS (33.33%)
P.O. Box 31119, Grand Pavilion Hibiscus Way 802
West Bay Road
KY1-1205 Grand Cayman, KY;
CSTONE PHARMACEUTICALS (SUZHOU) CO.,
LTD. (33.33%) y
CSTONE PHARMACEUTICALS (SHANGHAI) CO.,
LTD. (33.33%)

72 Inventor/es:

ZHENG, YONG;
LI, JING;
GOLOBOV, GENNADY;
ZHANG, XINHUA;
YANG, BAOTIAN;
TANG, ZHEWEI;
LI, DONG;
XU, JIANQING y
WANG, ZHUOZHI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 3 017 957 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 monoclonales contra la proteína de muerte programada 1 (PD-1)

Campo técnico

La presente invención se refiere en general a anticuerpos de PD-1 y a composiciones de los mismos, y a la inmunoterapia en el tratamiento de enfermedades humanas usando anticuerpos anti-PD-1.

Antecedentes de la invención

Los resultados preclínicos y clínicos demuestran cada vez más que seleccionar como diana los puntos de control inmunitario está convirtiéndose en el enfoque más prometedor para tratar a los pacientes con cáncer. La proteína de muerte programada 1 (PD-1), un miembro inhibidor de la superfamilia de inmunoglobulinas con homología con CD28, se expresa en células mieloides, células T, y células B activadas (*Agata et al.*, citado anteriormente; *Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82*; *Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8*) y desempeña un papel fundamental en la regulación de las señales estimuladoras e inhibitoras en el sistema inmunitario (*Okazaki, Taku et al. 2007 International Immunology 19:813-824*). PD-1 se descubrió a través de la detección de la expresión diferencial en células apoptóticas (*Ishida et al. (1992) EMBO J 11:3887-95*).

PD-1 es una proteína transmembrana de tipo I que forma parte de la superfamilia de genes de Ig (*Agata et al. (1996) bit Immunol 8:765-72*) y la estructura de PD-1 consiste en un dominio extracelular de tipo variable de inmunoglobulina y un dominio citoplásmico que contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) y un motivo de conmutación de inmunorreceptor basado en tirosina (ITSM). Aunque es estructuralmente similar a CTLA-4, PD-1 carece del motivo MYPPPY que es fundamental para la unión de B7-1 y B7-2. PD-1 tiene dos ligandos conocidos, PD-L1 (B7-H1, CD274) y PD-L2 (B7-DC, CD273), que son miembros de la familia de B7 expresados en la superficie celular (*Freeman et al. (2000) J Exp Med 192: 1027-34*; *Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2:261-8*; *Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32:634-43*). Tanto PD-L1 como PD-L2 son homólogos de B7 que se unen a PD-1, pero no se unen a otros miembros de la familia de CD28.

PD-1, como una de las proteínas de punto de control inmunitario, es un miembro inhibidor de la familia de CD28 que se expresa en células mieloides, células T, y células B activadas (*Agata et al.*, citado anteriormente; *Okazaki et al. (2002) Curr Opin Immunol 14: 391779-82*; *Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8*) y desempeña un papel fundamental en la limitación de la actividad de las células T que proporcionan un importante mecanismo de resistencia inmunitaria mediante el cual las células tumorales escapan a la vigilancia inmunitaria. PD-1 induce un estado de anergia o falta de respuesta en las células T, lo que hace que las células sean incapaces de producir niveles óptimos de citocinas efectoras. PD-1 también puede inducir la apoptosis en células T a través de su capacidad para inhibir las señales de supervivencia. Los animales deficientes en PD-1 desarrollan diversos fenotipos autoinmunitarios, incluyendo miocardiopatía autoinmunitaria y un síndrome similar al lupus con artritis y nefritis (*Nishimura et al. (1999) Immunity 11:141-51*; *Nishimura et al. (2001) Science 291:319-22*). Además, se ha descubierto que PD-1 desempeña un papel en la encefalomiелitis autoinmunitaria, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), la diabetes tipo I, y la artritis reumatoide (*Salama et al. (2003) J Exp Med 198:71-78*; *Prokunina y Alarcon-Riquelme (2004) Hum Mol Genet 13:R143*; *Nielsen et al. (2004) Lupus 11:510*). En una línea tumoral murina de células B, se demostró que el ITSM de PD-1 es esencial para bloquear el flujo de Ca²⁺ mediado por BCR y la fosforilación en tirosina de moléculas efectoras posteriores (*Okazaki et al. (2001) PNAS 98: 13866-71*).

La interacción de PD-1, expresada en las células T activadas, y PD-L1, expresado en las células tumorales, regulan negativamente la respuesta inmunitaria y merman la inmunidad antitumoral. PD-L1 es abundante en una variedad de cánceres humanos (*Dong et al. (2002) Nat. Med 8:787-9*). La expresión de PD-L1 en los tumores se correlaciona con una menor supervivencia en cáncer de esófago, cáncer de páncreas y otros tipos de cánceres, lo que destaca esta ruta como una nueva diana prometedora para la inmunoterapia tumoral. Varios grupos han demostrado que la interacción PD-1-PD-L agrava la enfermedad, dando como resultado una disminución de los linfocitos infiltrantes tumorales, una disminución de la proliferación mediada por receptores de células T, y una evasión inmunitaria por parte de las células cancerosas (*Dong et al. (2003) J. Mol. Med. 81:281-7*; *Blank et al. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314*; *Konishi et al. (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100*). La inmunosupresión puede revertirse inhibiendo la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando también se bloquea la interacción de PD-1 con PD-L2.

El anticuerpo anti-PD-1 nivolumab se ha caracterizado *in vitro* y se ha sometido a prueba en primates no humanos (*C. Wang et al. Cancer Immunology Research, vol. 2, n.º 9, 28 de mayo de 2014, páginas 846-856*). Varias empresas farmacéuticas, tales como Bristol-Myers Squibb (BMS), Merck, Roche y GlaxoSmithKline (GSK), han desarrollado múltiples agentes dirigidos a la ruta de PD-1. Los datos de los ensayos clínicos demostraron evidencias tempranas de una actividad clínica duradera y un perfil de seguridad alentador en pacientes con diversos tipos de tumores. El nivolumab, un fármaco anti-PD-1 desarrollado por BMS, está situándose en el centro del campo de nueva generación. Actualmente, en 6 estudios de fase avanzada, el tratamiento estimuló la reducción tumoral en tres de los cinco grupos de cáncer estudiados, incluyendo el 18 % de los pacientes con cáncer de pulmón (n=72),

cerca de un tercio de los pacientes con melanoma (n=98) y el 27 % de los pacientes con cáncer de riñón (n=33). Desarrollado por Merck, el pembrolizumab es un anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado que actúa contra PD-1, que obtuvo una nueva designación innovadora por parte de la FDA tras la presentación de impresionantes datos de IB para el cáncer de piel. Los resultados de un estudio de fase IB han demostrado una respuesta antitumoral objetiva en el 51 % de los pacientes con cáncer (n=85), y una respuesta completa en el 9 % de los pacientes. MPDL3280A (atezolizumab) experimental de Roche demostró su capacidad de reducción tumoral en 29 (21 %) de los 140 pacientes con cáncer avanzado con tumores de diversos tamaños.

En el documento WO 2016/077397 se han dado a conocer otros anticuerpos anti-PD-1.

Existen áreas de mejora para un anticuerpo contra PD-1 como agente terapéutico. La mayoría de los anticuerpos monoclonales contra PD-1 actualmente sometidos a prueba en ensayos clínicos son sólo contra PD-1 humana, lo que limita el ensayo preclínico *in vivo* y disminuye la eficacia debido a la inmunogenicidad de las secuencias proteicas derivadas de ratón. Los anticuerpos humanizados con reactividad cruzada frente a PD-1 de ratón superaron estas carencias y demostraron mayor tolerabilidad y eficacia *in vivo*. Por tanto, sigue siendo necesario un nuevo anticuerpo anti-PD-1.

15 Divulgación de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona anticuerpos aislados, en particular anticuerpos monoclonales.

La presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a PD-1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:

a) una región variable de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

b) una región variable de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

c) una región variable de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; o

d) una región variable de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mencionado anteriormente, en el que la PD-1 es PD-1 murina que es PD-1 de ratón o rata.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mencionado anteriormente, en el que el anticuerpo

a) se une a PD-1 humana con una K_D de $2,15E-10$ M o menos; y

b) se une a PD-1 de ratón con una K_D de $1,67E-08$ M o menos.

El anticuerpo mencionado anteriormente, en el que el anticuerpo

a) se une a PD-1 humana con una K_D de $2,15E-10$ M o menos; y

b) se une a PD-1 de ratón con una K_D de $1,67E-08$ M o menos, y

en el que el anticuerpo presenta al menos una de las siguientes propiedades:

a) se une a PD-1 humana con una K_D de entre $4,32E-10$ M y $2,15E-10$ M y a PD-1 de ratón con una K_D de entre $5,39E-8$ M y $1,67E-8$ M;

b) no se une sustancialmente a CD28 humano, CTLA-4;

c) aumenta la proliferación de células T;

d) aumenta la producción de interferón-gamma; o

e) aumenta la secreción de interleucina-2.

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

a) una región variable de una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1; y

- b) una región variable de una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3,
- en el que el anticuerpo se une específicamente a PD-1;
- 5 a) una región variable de una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2; y
- b) una región variable de una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3,
- en el que el anticuerpo se une específicamente a PD-1;
- 10 a) una región variable de una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2; y
- b) una región variable de una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4,
- en el que el anticuerpo se une específicamente a PD-1;
- o el anticuerpo comprende:
- 15 a) una región variable de una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2; y
- b) una región variable de una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5,
- en el que el anticuerpo se une específicamente a PD-1.
- 20 La secuencia de dicho anticuerpo se muestra en la tabla 1 y en el listado de secuencias. Los anticuerpos distintos de 1H6, 2E5, 2G4, y 2C2 no forman parte de la presente invención.

Tabla 1. Secuencia del anticuerpo

ID de clon		SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
1H6	Cadena pesada	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAILGYFDYWGQG TMVTVSS
	Cadena ligera	3	DVVMITQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGGTY LYWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLE IK
2E5	Cadena pesada	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWGQGT MVTVSS
	Cadena ligera	3	DVVMITQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGGTY LYWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLE IK
2G4	Cadena pesada	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWGQGT MVTVSS
	Cadena ligera	4	DVVMITQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLDSDGSTYL YWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLEI K
2C2	Cadena pesada	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFKGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIIGYFDYWGQGT MVTVSS

	Cadena ligera	5	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGATYL YWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLEI K
A6W	Cadena pesada	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAILGYFDYWGQG TMVTVSS
	Cadena ligera	6	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGNTY LYWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLE IK
1G10	Cadena pesada	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAILGYFDYWGQG TMVTVSS
	Cadena ligera	5	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGATY YWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLEI K
2B1	Cadena pesada	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIIGYFDYWGQGT MTVSS
	Cadena ligera	6	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGNTY LYWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHWPYTFGQGTKLE IK
L1I	Cadena pesada	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIIGYFDYWGQGT MTVSS
	Cadena ligera	7	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGNTY LYWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHAPYTFGQGTKLE IK
5C4	Cadena pesada	1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAILGYFDYWGQG TMVTVSS
	Cadena ligera	8	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGQTY LYWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHEPYTFGQGTKLEI K
8C10	Cadena pesada	2	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFTTYYISW VRQAPGQGLEYLGYINMGSGGTNYNEKFGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAIIGYFDYWGQGT MTVSS
	Cadena ligera	9	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGQTY LYWFQQRPGQSPRRLIYLVSTLGSVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCMQLTHENYTFGQGTKLE IK

El anticuerpo 1H6 que es un anticuerpo según la presente invención comprende:

- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 10;
- una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 11;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 12;
- una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 14;
- una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19;
- una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 20;

en el que el anticuerpo se une específicamente a PD-1.

El anticuerpo 2E5 que es otro anticuerpo según la presente invención comprende:

- a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 10;
- b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 11;
- 5 c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 13;
- d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 14;
- e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19;
- f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 21;

en el que el anticuerpo se une específicamente a PD-1.

10 El anticuerpo 2G4 que es otro anticuerpo según la presente invención comprende:

- a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 10;
- b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 11;
- c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 13;
- d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 15;
- 15 e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19;
- f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 21;

en el que el anticuerpo se une específicamente a PD-1.

El anticuerpo 2C2 que es otro anticuerpo según la presente invención comprende:

- a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 10;
- 20 b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 11;
- c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 13;
- d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 16;
- e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19;
- f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 21;

25 en el que el anticuerpo se une específicamente a PD-1.

La secuencia de CDR de dicho anticuerpo se muestra en la tabla 2 y en el listado de secuencias. Los anticuerpos distintos de 1H6, 2E5, 2G4, y 2C2 no forman parte de la presente invención.

Tabla 2. Secuencia del anticuerpo

ID de clon		SEQ ID NO	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3
1H6	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	Cadena ligera	14	RSSQSLDSDGGTYLY	19	LVSTLGS	20	MLTHENYT
2E5	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	Cadena ligera	14	RSSQSLDSDGGTYLY	19	LVSTLGS	21	MLTHWPYT
2G4	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	Cadena ligera	15	RSSQSLDSDGSTLY	19	LVSTLGS	21	MLTHWPYT

2C2	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	Cadena ligera	16	RSSQSLSDSGATYLY	19	LVSTLGS	21	MLITHWPYT
A6W	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	Cadena ligera	17	RSSQSLSDSGNTYLY	19	LVSTLGS	21	MLITHWPYT
1G10	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	Cadena ligera	16	RSSQSLSDSGATYLY	19	LVSTLGS	21	MLITHWPYT
2B1	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	Cadena ligera	17	RSSQSLSDSGNTYLY	19	LVSTLGS	21	MLITHWPYT
L11	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	13	IGYFDY
	Cadena ligera	17	RSSQSLSDSGNTYLY	19	LVSTLGS	22	MLITHAPYT
5C4	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	Cadena ligera	18	RSSQSLSDSGQTYLY	19	LVSTLGS	23	MLITHEPYT
8C10	Cadena pesada	10	TYYSIS	11	YINMGSGGTNYNEKFKG	12	LGYFDY
	Cadena ligera	18	RSSQSLSDSGQTYLY	19	LVSTLGS	20	MLITHENYT

Los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos de la invención pueden presentar al menos una de las siguientes propiedades:

a) se unen a PD-1 humana con una K_D de $2,15E-10$ M o menos y a PD-1 de ratón con una K_D de $1,67E-08$ M o menos;

5 b) no se unen sustancialmente a CD28 humano, CTLA-4;

c) aumentan la proliferación de células T;

d) aumentan la producción de interferón-gamma; o

e) aumentan la secreción de interleucina-2.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

La invención proporciona un vector de clonación o expresión que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

La invención también proporciona una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión.

15 En aún otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento, que comprende cultivar la célula huésped de la invención y aislar el anticuerpo, en el que el anticuerpo se prepara mediante inmunización en rata SD con dominio extracelular de PD-1 humana y dominio extracelular de PD-1 de ratón.

La invención proporciona un ratón transgénico que comprende transgenes de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana, en el que el ratón expresa el anticuerpo de esta invención.

20 La invención proporciona un hibridoma preparado a partir del ratón de esta invención, en el que el hibridoma produce dicho anticuerpo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo de la invención, y uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

25 La invención proporciona un inmunoconjugado que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en esta invención unido a un agente terapéutico.

En este caso, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende dicho inmunocombinado y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

También se da a conocer, pero no forma parte de la invención, un método para preparar un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende:

- 5 (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, una secuencia de CDR2 que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, y una secuencia de CDR3 que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12 y 13; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDR1 que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17 y 18, una secuencia de CDR2 que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 19, y una secuencia de CDR3 que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 21, 22 y 23; y

(b) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

La invención también proporciona el anticuerpo según la presente invención para su uso en un método para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno inmunitario o cáncer.

- 15 En una realización, el método es un método para el tratamiento o la profilaxis del cáncer mediante la inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto, comprendiendo dicho método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo para inhibir el crecimiento de las células tumorales.

- 20 En una realización, el método es un método en el que las células tumorales son de un cáncer seleccionado de un grupo que consiste en melanoma, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, y cáncer de recto.

En una realización, el método es un método en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

Características y ventajas de esta invención

- 25 Los inventores han generado un anticuerpo humanizado contra PD-1 utilizando la tecnología de hibridoma patentada. Los anticuerpos notificados en esta invención tienen una alta afinidad de unión, uniéndose específicamente a la proteína PD-1 tanto humana como de ratón sin reacciones entre familias; y potentes respuestas inmunitarias moduladoras, incluyendo la potenciación de la proliferación de células T y el aumento de la producción de las citocinas IFN- γ e interleucina-2.

- 30 Los nuevos anticuerpos anti-PD-1 que se unen a PD-1 de ratón se derivan de ratas inmunizadas, lo que supera la desventaja de que los anticuerpos anti-PD-1 no pueden utilizarse en el modelo preclínico de ratón; y el nivel humanizado es cercano al 100 % después de la humanización de secuencia, lo que reduce en gran medida los efectos adversos de los fármacos utilizados en el cuerpo humano.

Breve descripción de los dibujos

Los anticuerpos distintos de 1H6, 2E5, 2G4, y 2C2 no forman parte de la presente invención.

- 35 La figura 1 muestra gráficos de la unión de anticuerpos de hibridoma a PD-1 humana y de ratón de superficie celular. La figura 1A muestra la unión a PD-1 humana. La figura 1B muestra la unión a PD-1 de ratón.

La figura 2 muestra el resultado de la primera ronda de cribado de biblioteca de mutagénesis. Secuencia y análisis de mutaciones en clones de alta afinidad para la segunda ronda de mutación.

- 40 La figura 3 muestra los resultados de la prueba entre especies mediante FACS. La figura 3A muestra la unión a células CHO-S transfectadas con PD-1 humana. La figura 3B muestra la unión a células 293F transfectadas con PD-1 de ratón. La figura 3C muestra la unión a PBMC de macaco cangrejero activadas. Nota: el isotipo fue IgG4 kappa humana. Lo mismo a continuación.

- 45 La figura 4 muestra el resultado de la prueba entre familias mediante ELISA. La figura 4A muestra la unión a PD-1 humana. La figura 4B muestra la unión a PD-1 de ratón. La figura 4C muestra la unión a PD-1 de macaco cangrejero.

La figura 5 muestra el resultado de la prueba entre familias. Los anticuerpos anti-PD-1 se unen específicamente a PD-1 humana, pero no a CD28 ni a CTLA-4.

- 50 La figura 6A muestra el resultado de anticuerpos anti-PD-1 que bloquean la unión de PD-L1 humano a células CHO-S transfectadas con PD-1. La figura 6B muestra el resultado de anticuerpos anti-PD-1 que bloquean la unión de PD-L1 de ratón a células 293F transfectadas con PD-1.

La figura 7 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 pueden bloquear la unión de PD-L2 humano a PD-1.

Las figuras 8A-8B muestran los resultados del ensayo de agrupación de epítomos, lo que sugiere que los anticuerpos anti-PD-1 se encuentran en el mismo grupo o en un grupo cercano de epítomos que los anticuerpos de referencia. La figura 8A muestra la agrupación frente a WBP305BMK1 (documento US9084776). La figura 8B muestra la agrupación frente a Keytruda (documento US8168757).

La figura 9 muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-PD-1 con PD-1 humana/de ratón. Se recubrieron 2 µg/ml de cada anticuerpo en una placa de 96 pocillos durante la noche y se incubaron con la proteína hPD-1/mPD-1-His; a continuación, se añadió el anticuerpo HRP-anti-His para la detección.

La figura 10 muestra los residuos de puntos calientes mapeados en la estructura de hPD-1. (A). Sitio de unión de hPD-L1. Los datos se obtuvieron de la bibliografía Zak *et al.* 2015. (B-C). Sitio de unión del anticuerpo W3052_r16.88.9 y Keytruda, respectivamente. Los datos se obtuvieron de la tabla 8. Los colores en las imágenes son para ayudar a distinguir las diferencias entre epítomos.

La figura 11 muestra la comparación entre PD-1 humana y murina. Sus diferencias estructurales obvias (bucle BC y bucle C'D (o cadena C" en mPD-1)) se marcaron en color naranja. (A). Estructuras de hPD-1 (código PDB 4ZQK). Los bucles que faltaban (Asp85-Asp92) se remodelaron basándose en sus estructuras por RMN (código PDB 2M2D). (B). Estructura de mPD-1 (código PDB 3BIK).

Las figuras 12A-12C muestran los resultados de la alo-MLR humana que demuestran que los anticuerpos anti-PD-1 pueden potenciar la función de las células T CD4⁺ humanas. La figura 12A muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la secreción de IL-2 de manera dependiente de la dosis. La figura 12B muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la secreción de IFN-γ de manera dependiente de la dosis. La figura 12C muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la proliferación de células T CD4⁺ de manera dependiente de la dosis.

Las figuras 13A-13C muestran los resultados de la alo-MLR de ratón que demuestran que los anticuerpos anti-PD-1 pueden potenciar la función de las células T CD4⁺ de ratón. La figura 13A muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la secreción de IL-2 de manera dependiente de la dosis. La figura 13B muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la secreción de IFN-γ de manera dependiente de la dosis. La figura 13C muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la proliferación de células T CD4⁺ de manera dependiente de la dosis.

Las figuras 14A-14B muestran los resultados de la alo-MLR humana que demuestran que los anticuerpos anti-PD-1 pueden potenciar la función de las células T CD4⁺ humanas. La figura 14A muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la secreción de IFN-γ de manera dependiente de la dosis. La figura 14B muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la proliferación de células T CD4⁺ de manera dependiente de la dosis.

La figura 15 demuestra que los anticuerpos anti-PD-1 pueden revertir la función supresora de las Treg. La figura 15A muestra que los anticuerpos anti-PD-1 pueden restablecer la secreción de IFN-γ. La figura 15B muestra que los anticuerpos anti-PD-1 pueden restablecer la proliferación de células T.

La figura 16 muestra el resultado de la prueba de ADCC que demuestra que los anticuerpos anti-PD-1 no median en la actividad de ADCC en las células T CD4⁺ activadas.

La figura 17 muestra el resultado de la prueba de CDC que demuestra que los anticuerpos anti-PD-1 no median en la actividad de CDC en las células T CD4⁺ activadas.

La figura 18 muestra los cambios de peso corporal en el modelo de ratón desnudo con tumor singénico tras el tratamiento con 2E5. El punto de datos representa el peso corporal promedio; las barras de error representan el error estándar (EEM).

La figura 19 muestra los cambios relativos de peso (%). El cambio relativo en el peso corporal se calculó basándose en el peso corporal al inicio de la administración. El punto de datos representa el peso corporal promedio; las barras de error representan el error estándar (EEM).

La figura 20 muestra la curva de crecimiento tumoral en el modelo de ratón desnudo con tumor singénico CloudmanS91 tras el tratamiento con 2E5. El punto de datos representa el peso corporal promedio; las barras de error representan el error estándar (EEM).

La figura 21 muestra la curva de supervivencia en el modelo de ratón desnudo con tumor singénico CloudmanS91 tras el tratamiento con 2E5.

Descripción detallada

Para facilitar la comprensión de la presente invención, en primer lugar se definen algunos términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

Los términos "proteína de muerte programada 1", "proteína de muerte celular programada 1", "proteína PD-1", "PD-

1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" y "hPD-F" se utilizan indistintamente, e incluyen variantes, isoformas, especies homólogas de PD-1 humana, y análogos que tienen al menos un epítipo común con PD-1.

El término "anticuerpo", al que se hace referencia en el presente documento incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de la misma. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada consta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera consta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno.

El término "anticuerpo", tal como se utiliza en esta divulgación, se refiere a una inmunoglobulina o a un fragmento o derivado de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno, independientemente de si se produce *in vitro* o *in vivo*. El término incluye, pero no se limita a, anticuerpos policlonales, monoclonales, monoespecíficos, poliespecíficos, inespecíficos, humanizados, de cadena sencilla, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, e injertados. El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, dAb, y otros fragmentos de anticuerpo que conservan la función de unión a antígeno, es decir, la capacidad de unirse específicamente a PD-1. Normalmente, tales fragmentos comprenderían un fragmento de unión a antígeno.

Los términos "fragmento de unión a antígeno", "dominio de unión a antígeno", y "fragmento de unión" se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. En casos en los que un antígeno es grande, el fragmento de unión a antígeno puede unirse sólo a una parte del antígeno. La parte de la molécula de antígeno responsable de las interacciones específicas con el fragmento de unión a antígeno se denomina "epítipo" o "determinante antigénico".

Un fragmento de unión a antígeno comprende normalmente una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo; sin embargo, no necesariamente tiene que comprender ambas. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo denominado Fd consiste únicamente en un dominio VH, pero aún conserva parte de la función de unión a antígeno del anticuerpo intacto.

En línea con lo anterior, el término "epítipo" define un determinante antigénico, que está específicamente unido a/identificado por un fragmento de unión tal como se definió anteriormente. El fragmento de unión puede unirse/interactuar específicamente a/con epítopos conformacionales o continuos, que son singulares para la estructura diana, por ejemplo, PD-1 humana y murina. Un epítipo conformacional o discontinuo se caracteriza para los antígenos polipeptídicos por la presencia de dos o más residuos de aminoácidos discretos que están separados en la secuencia primaria, pero que se juntan en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega para dar lugar a la proteína/antígeno nativo. Los dos o más residuos de aminoácidos discretos que contribuyen al epítipo están presentes en secciones separadas de una o más cadenas polipeptídicas. Estos residuos se unen en la superficie de la molécula cuando la(s) cadena(s) polipeptídica(s) se pliega(n) para dar lugar a una estructura tridimensional para constituir el epítipo. Por el contrario, un epítipo continuo o lineal consiste en dos o más residuos de aminoácidos discretos, que están presentes en un único segmento lineal de una cadena polipeptídica.

La expresión "se une a un epítipo de PD-1" se refiere a que los anticuerpos tienen unión específica para un epítipo particular de PD-1, que puede estar definido por una secuencia de aminoácidos lineal, o por una conformación terciaria, es decir, tridimensional, en parte del polipéptido PD-1. Unión significa que la afinidad de los anticuerpos por la porción de PD-1 es sustancialmente mayor que su afinidad por otros polipéptidos relacionados. La expresión "afinidad sustancialmente mayor" significa que hay un aumento medible de la afinidad por la porción de PD-1 en comparación con la afinidad por otros polipéptidos relacionados. Preferiblemente, la afinidad es al menos de 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, 10³ veces, 10⁴ veces, 10⁵ veces, 10⁶ veces o más para la porción particular de PD-1 que para otras proteínas. Preferiblemente, la afinidad de unión se determina mediante ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), o mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o resonancia de plasmón superficial (SPR). Más preferiblemente, la especificidad de unión se obtiene mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

El término "reactividad cruzada" se refiere a la unión de un fragmento de antígeno descrito en el presente documento a la misma molécula diana en seres humanos y murinos (ratón o rata). Por tanto, se entiende por "reactividad cruzada" una reactividad entre especies a la misma molécula X expresada en diferentes especies, pero no a una molécula distinta de X. La especificidad entre especies de un anticuerpo monoclonal que reconoce, por ejemplo, PD-1 humana, con respecto a una PD-1 murina (ratón o rata), puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de FACS.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Salvo que se indique lo contrario, los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan indistintamente.

- 5 Los términos "tratamiento" y "método terapéutico" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas/preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento pueden incluir individuos que ya padecen un trastorno médico particular, así como aquellos que pueden acabar padeciendo el trastorno.

Ejemplos

Los anticuerpos distintos de 1H6, 2E5, 2G4, y 2C2 no forman parte de la presente invención.

10 Ejemplo 1: Preparación de materiales de investigación

1. Generación de inmunógenos

- 15 Se sintetizaron ADN que codifican para el ECD o la longitud completa de PD-1 y PD-L1 y se insertaron en el vector de expresión pcDNA3.3. Se realizó una preparación máxima de los ADN plasmídicos y se verificaron las secuencias de ADN insertadas mediante secuenciación. Las proteínas de fusión ECD de PD-1 y ECD de PD-L1 que contienen diversas etiquetas, incluyendo etiquetas Fc humana, Fc de ratón e His, se obtuvieron por transfección del gen ECD de PD-1 humano en células CHO-S o HEK293. Después de 5 días, se recogieron sobrenadantes del cultivo de células transfectadas transitoriamente. Las proteínas de fusión se purificaron y cuantificaron para su uso en inmunización y cribado.

2. Establecimiento de líneas celulares estables

- 20 Con el fin de obtener herramientas para el cribado y la validación de anticuerpos, se generaron líneas celulares de transfección de PD-1 y PD-L1. Brevemente, las células CHO-K1 o 293F se transfectaron con el vector de expresión pcDNA3.3 que contenía PD-1 o PD-L1 de longitud completa utilizando el kit de transfección Lipofectamine 2000 según el protocolo del fabricante. 48-72 horas después de la transfección, las células transfectadas se cultivaron en medio que contenía blasticidina o G418 para seleccionar las células que tenían los genes PD-1 o PD-L1 incorporados de manera estable en sus ADN genómicos. Mientras tanto, se comprobó la expresión de los genes PD-1 y PD-L1 interesados en las células. Una vez verificada la expresión, se recogieron clones individuales de interés mediante dilución limitada y se aumentaron de escala a grandes volúmenes. A continuación, las líneas celulares monoclonales establecidas se mantuvieron en un medio que contenía dosis más bajas de los antibióticos blasticidina o G418.

30 Ejemplo 2: Generación de hibridomas de anticuerpos

1. Inmunización

- 35 Se inmunizaron ratas SD hembra, de 6-8 semanas de edad, con 10 µg/animal de proteína ECD de PD-1 humana y 10 µg/animal de proteína ECD de PD-1 de ratón en TiterMax mediante inyección en la almohadilla plantar para la primovacunación, y se reforzaron dos veces por semana con proteína ECD de PD-1 humana o proteína ECD de PD-1 de ratón en aluminio alternativamente. Los títulos de anticuerpos en suero se midieron por ELISA o FACS cada dos semanas.

2. Fusión celular

- 40 Cuando el título de anticuerpos en suero fue suficientemente alto, se administró a las ratas un refuerzo final con proteína ECD de PD-1 tanto humana como de ratón en el mismo volumen de D-PBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) sin adyuvante. La fusión celular se realizó de la siguiente manera: preparación de células de mieloma SP2/0, las células de mieloma se descongelaron la semana anterior a la fusión, y se dividieron a razón de 1:2 cada día hasta el día anterior a la fusión para mantenerlas en crecimiento logarítmico. Se combinaron linfocitos B aislados de ganglios linfáticos de ratas SD inmunizadas con células de mieloma (a razón 1:1). Las células se trataron con tripsina y la reacción se detuvo con FBS. A continuación, se lavó la mezcla de células y se volvió a suspender en disolución de ECF a 2×10^6 células/ml para ECF. Tras la fusión celular electrónica (BTX2000), la suspensión celular de la cámara de fusión se transfirió inmediatamente a un tubo estéril que contenía más medio, y se incubó durante al menos 24 horas en una incubadora a 37 °C. A continuación, se mezcló la suspensión celular y se transfirió a placas de 96 pocillos (1×10^4 células/pocillo). Las placas de 96 pocillos se cultivaron a 37 °C, el 5 % de CO₂, y se monitorizaron periódicamente. Cuando los clones eran suficientemente grandes (al cabo de 7-14 días), se transfirieron 100 µl de sobrenadante de las placas de histocultivo a placas de ensayo de 96 pocillos para el cribado de anticuerpos.

3. Cribado primero, segundo y de confirmación de los sobrenadantes de hibridoma

El ensayo ELISA se utilizó como primer método de cribado para someter a prueba la unión de los sobrenadantes de hibridoma a la proteína PD-1 humana o de ratón. Brevemente, las placas (Nunc) se recubrieron con ECD de PD-1

humana o de ratón a 1 µg/ml durante la noche a 4 °C. Tras el bloqueo y el lavado, se cargaron los sobrenadantes de hibridoma en las placas recubiertas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se lavaron las placas y se incubaron posteriormente con anticuerpo secundario de cabra anti-Fc de IgG de rata conjugado con HRP (Bethyl) durante 1 h. Tras el lavado, se añadió sustrato TMB y se detuvo la reacción con HCl 2 M. La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices).

Con el fin de confirmar la unión nativa de los anticuerpos anti-PD-1 a las moléculas de PD-1 conformacionales expresadas en la membrana celular, se realizó un análisis de FACS utilizando líneas celulares transfectadas con PD-1 como segundo cribado. Las células CHO-S que expresaban PD-1 humana o las células 293F que expresaban PD-1 de ratón se transfectaron en placas de 96 pocillos con fondo en U (Corning) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. A continuación se añadieron los sobrenadantes de hibridoma y se incubaron con las células durante 1 h a 4 °C. Tras lavar con 1×PBS/BSA al 1 %, se aplicó el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de rata conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch Lab) y se incubó con las células a 4 °C en la oscuridad durante 1 h. A continuación, las células se lavaron y resuspendieron en 1×PBS/BSA al 1 % o se fijaron con paraformaldehído al 4 %, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD) y el software FlowJo. La unión del anticuerpo a la línea celular CHO-S o 293F parental se utilizó como control negativo, respectivamente.

Para seleccionar posibles resultados positivos antagonistas, se sometió a prueba la capacidad de los anticuerpos seleccionados para bloquear la unión del ligando PD-L1 a las células transfectadas con PD-1 mediante análisis de FACS. Las células CHO-S que expresaban PD-1 humana o las células 293F que expresaban PD-1 de ratón se transfectaron en placas de 96 pocillos con fondo en U (BD) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Se añadieron los sobrenadantes de hibridoma y se incubaron con las células a 4 °C durante 1 h. Tras el lavado, se añadió proteína de fusión Fc de ratón-PD-L1 humana o proteína de fusión Fc de ratón-PD-L1 de ratón y se incubó a 4 °C durante 1 h. El anticuerpo secundario de cabra anti-Fc de IgG de ratón conjugado con FITC (sin reactividad cruzada con Fc de IgG de rata, Jackson ImmunoResearch Lab) se incubó con las células a 4 °C en la oscuridad durante 1 h. A continuación, las células se lavaron y resuspendieron en 1×PBS/BSA al 1 % o se fijaron con paraformaldehído al 4 %, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD) y el software FlowJo.

La figura 1 muestra gráficos de 16 anticuerpos de hibridoma que se unen a la superficie celular de PD-1 humana y de ratón. La figura 1A muestra la unión a PD-1 humana. La figura 1B muestra la unión a PD-1 de ratón.

4. Subclonación de hibridomas

Una vez verificadas la unión específica y la actividad de bloqueo mediante el cribado primero y de confirmación, las líneas celulares de hibridoma positivas se utilizaron para la subclonación. Brevemente, para cada línea celular de hibridoma, se contaron las células y se diluyeron para obtener 5 células, 1 célula o 0,5 células por 200 µl de medio de clonación. La suspensión celular se sembró a 200 µl/pocillo en placas de 96 pocillos, una placa a 5 células/pocillo, una placa a 1 célula/pocillo y cuatro placas a 0,5 células/pocillo. Las placas se cultivaron a 37 °C, el 5 % de CO₂, hasta que estuvieron listas para el cribado mediante ELISA de unión o FACS tal como se describió anteriormente. Se recogieron ESN de los clones individuales seleccionados, y se purificaron los anticuerpos para su posterior caracterización.

5. Pruebas de subtipos

Se recubrieron 50 µl de anticuerpos de cabra anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG o IgM de rata (1 µg/ml) en placas de microtitulación (Nunc) por pocillo durante la noche. Tras el bloqueo, se añadieron 50 µl de muestras de sobrenadante de hibridoma a cada pocillo, incubándose durante 2 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario de cabra anti-cadena ligera kappa o lambda de IgG de rata conjugado con HRP (Bethyl) es un anticuerpo de detección. A continuación, utilizando sustrato TMB para el color, se extinguió la reacción con HCl 2 M. El valor de absorción de luz a 450 nm se lee utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices).

La tabla 3 muestra los resultados de subtipos de 16 anticuerpos de hibridoma. 7 anticuerpos son anticuerpos policlonales, y 9 anticuerpos son del subtipo kappa de IgG2a. Teniendo en cuenta las necesidades del anticuerpo anti-PD-1 para evitar el papel de ADCC y CDC *in vivo*, el anticuerpo humanizado se construirá como subtipo kappa de IgG4 humana.

Tabla 3. Subtipos de anticuerpos de hibridoma

Número	anticuerpo	kappa			
		IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM
1	W3052_r16.6.25	-	-	+	débil
2	W3052_r16.14.6	+	+	-	-

ES 3 017 957 T3

3	W3052_r16.14.16	-	+	-	+
4	W3052_r16.16.14	+	+	-	+
5	W3052_r16.53.26	+	+	-	-
6	W3052_r16.68.22	-	+	-	-
7	W3052_r16.68.41	-	+	-	-
8	W3052_r16.81.3	-	-	+	+
9	W3052_r16.88.9	-	+	-	-
10	W3052_r16.88.21	débil	+	-	-
11	W3052_r16.88.29	-	débil	-	-
12	W3052_r16.88.32	-	+	-	-
13	W3052_r16.114.2		+		
14	W3052_r16.114.8	-	+	-	-
15	W3052_r16.114.15	-	+	-	-
16	W3052_r16.114.39	-	+	-	-

Ejemplo 3: Secuencia celular de hibridoma de anticuerpos y construcción de moléculas de anticuerpos humanizados y maduración por afinidad

1. Secuencia celular de hibridoma de anticuerpos

- 5 Los ARN se aislaron a partir de células de hibridoma monoclonal con el reactivo Trizol. Las VH y VL de los anticuerpos quiméricos contra PD-1 se amplificaron de la siguiente manera: en primer lugar se somete a transcripción inversa el ARN para dar ADNc utilizando una transcriptasa inversa tal como se describe en este caso.

Sistema de reacción (20 µl)

Tampón 10×RT	2,0 µl
Mezcla 25×dNTP (100 mM)	0,8 µl
10×RT cebadores aleatorios/oligodT/cebadores específicos	2,0 µl
Transcriptasa inversa MultiScribe™	1,0 µl
Inhibidor de ARNasa	1,0 µl
ARN	2 µg
H ₂ O libre de nucleasas	hasta 20,0 µl

Condiciones de reacción

	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120 min	5	∞

El ADNc resultante se utilizó como plantilla para la posterior amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para los genes interesados. La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera:

ADNc	1 µl
Tampón Ex PCR	5 µl
dNTP	2 µl
ExTaq	0,5 µl
P1 (25 pM)	0,5 µl
P2 (25 pM)	0,5 µl
ddH ₂ O	40,5 µl

Condiciones de reacción:

94 °C 3 min

94 °C	30 s	} 30 ciclos
60 °C	30 s	

72 °C 1 min

72 °C 10 min

- 5 El producto de PCR resultante (10 µl) se ligó con el vector pMD18-T. Se transformaron células competentes Top10 con 10 µl del producto de ligación. Los clones positivos se comprobaron por PCR utilizando los cebadores M13-48 y M13-47, seguido de secuenciación.

2. Construcción de moléculas de anticuerpos humanizados

- 10 Se seleccionó el anticuerpo anti-PD-1 de rata procedente de hibridomas y se humanizó según la alta afinidad y especificidad de unión del anticuerpo anti-PD-1 a PD-1, mejorando la homología con la secuencia del anticuerpo humano. Dicho uso humanizado se denomina técnica de injerto de CDR. El gen de región variable del anticuerpo, tal como las regiones FR y las regiones CDR, se dividió mediante el sistema KABAT y el sistema IMGT. En la base de datos de anticuerpos, basándose en las alineaciones de homología de secuencia de unión y similitud estructural, el gen de la región murina FR1-3 se sustituyó por la región variable humanizada FR1-3, la región FR4 del gen murino se sustituyó por la región FR4 humanizada derivada de los genes JH y JK que tenían las estructuras más similares.
- 15 Tras verificar la secuencia de plantilla y optimizar los codones, se sintetizaron la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera y se clonaron en el vector de expresión, expresando entonces el anticuerpo humanizado.

- 20 Según la capacidad de unión a la superficie celular de PD-1 humana y de ratón, se seleccionaron W3052_r16.88.9 y W3052_r16.81.3 para la humanización. La tabla 2 muestra el análisis de las puntuaciones de humanización. Se seleccionaron los clones W3052-16.88-z9-IgG4 (42720) para la maduración por afinidad teniendo en cuenta todos estos factores, tales como la afinidad y las puntuaciones de humanización mejores (tabla 4).

Tabla 4

Anticuerpo principal		FR1		FR2	FR3	FR4		Puntuación de humanización
W3052_r16.88.hAc1 40798	WBP305_r16.88-hVH1-m	IGHV1-69*06	100 %	100 %	93,30 %	IGHJ3*01	100 %	99,16 %

ES 3 017 957 T3

	WBP305_r16. 88-VL1	IGKV2- 29*02	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 88.hAc2 40764	WBP305_r16. 88-hVH2	IGHV1- 69*06	100 %	(IGHV1- 8*01) 100 %	93,30 %	IGHJ3* 01	100 %	99,16 %
	WBP305_r16. 88-VL1	IGKV2- 29*02	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 88.hAc3 40766	WBP305_r16. 88-hVH3	IGHV1- 69*06	100 %	85,70 %	93,30 %	IGHJ3* 01	100 %	97,38 %
	WBP305_r16. 88-VL1	IGKV2- 29*02	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 88.hAc4 40770	WBP305_r16. 88-hVH1	IGHV1- 69*06	100 %	100 %	93,30 %	IGHJ3* 01	100 %	99,16 %
	WBP305_r16. 88-VL2	IGKV2- 30*01	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 88.hAc5 40773	WBP305_r16. 88-hVH2-m	IGHV1- 69*06	100 %	(IGHV1- 8*01) 100 %	93,30 %	IGHJ3* 01	100 %	99,16 %
	WBP305_r16. 88-VL2	IGKV2- 30*01	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 88.hAc6 40800	WBP305_r16. 88-hVH3-m	IGHV1- 69*06	100 %	85,70 %	93,30 %	IGHJ3* 01	100 %	97,38 %
	WBP305_r16. 88-VL2	IGKV2- 30*01	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 88-z7-IgG4 42691	WBP305_r16. 88-hVH1	IGHV1- 69*06	100 %	100 %	100 %	IGHJ3* 01	100 %	100 %

ES 3 017 957 T3

	WBP305_r16. 88-VL1	IGKV2- 29*02	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 88-z8-IgG4 42715	WBP305_r16. 88-hVH2	IGHV1- 69*06	100 %	(IGHV1- 8*01) 100 %	100 %	IGHJ3* 01	100 %	100 %
	WBP305_r16. 88-VL2	IGKV2- 30*01	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 88-z9-IgG4 42720	WBP305_r16. 88-hVH3	IGHV1- 69*06	100 %	85,70 %	100 %	IGHJ3* 01	100 %	98,20 %
	WBP305_r16. 88-VL2	IGKV2- 30*01	100 %	100 %	100 %	IGKJ2* 01	100 %	
W3052_r16. 81.hAc1 40779	WBP305_r16. 81-VH1	IGHV3- 7*03	100 %	100 %	100 %	IGHJ1* 01	100 %	100 %
	WBP305_r16. 81-VL1	IGKV1D- 16*02	100 %	100 %	100 %	IGKJ4* 01	100 %	
W3052_r16. 81.hAc2 40781	WBP305_r16. 81-VH2	IGHV3- 9*01	100 %	100 %	100 %	IGHJ1* 01	100 %	100 %
	WBP305_r16. 81-VL1	IGKV1D- 16*02	100 %	100 %	100 %	IGKJ4* 01	100 %	
W3052_r16. 81.hAc3 40784	WBP305_r16. 81-VH1	IGHV3- 7*03	100 %	100 %	100 %	IGHJ1* 01	100 %	100 %
	WBP305_r16. 81-VL2	IGKV1- 39*01	100 %	100 %	100 %	IGKJ4* 01	100 %	
W3052_r16. 81.hAc4 40787	WBP305_r16. 81-VH2	IGHV3- 9*01	100 %	100 %	100 %	IGHJ1* 01	100 %	100 %

	WBP305_r16. 81-VL2	IGKV1- 39*01	100 %	100 %	100 %	IGKJ4* 01	100 %	
--	-----------------------	-----------------	-------	-------	-------	--------------	-------	--

3. Maduración por afinidad

Cada aminoácido de tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR3 de VH, CDR1 de VK, y CDR3 de VK) del clon parental se mutó individualmente a otros 20 aminoácidos utilizando un método de mutagénesis por hibridación. Se utilizaron cebadores de ADN que contenían un codón NNS que codifica para veinte aminoácidos para introducir la mutación en cada posición de CDR objetivo. Los cebadores degenerados individuales se utilizaron en reacciones de mutagénesis por hibridación. Brevemente, se fosforiló cada cebador degenerado, y luego se utilizó a razón de 10:1 con ADNmc uridinilado. La mezcla se calentó hasta 85 °C durante 5 minutos y luego se enfrió hasta 55 °C a lo largo de 1 hora. A continuación, se añadieron ligasa T4 y ADN polimerasa T4 y la mezcla se incubó durante 1,5 horas a 37 °C. Los productos de síntesis de las CDR de VH y VL se agruparon respectivamente. Normalmente, se sometieron a electroporación 200 ng del ADN de biblioteca agrupado en BL21 para la formación de placas en el césped bacteriano BL21 o para la producción de fragmentos scFv.

El cribado primario consistió en un ensayo ELISA de punto único (SPE) que se llevó a cabo utilizando extracto periplásmico (PE) de bacterias cultivadas en placas de 96 pocillos (pocillo profundo). Brevemente, este ELISA de captura consistió en recubrir pocillos individuales de una inmunoplaaca Maxisorp de 96 pocillos con anticuerpo anti-c-myc en tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 200 mM/ NaHCO_3) a pH 9,2 durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la placa se bloqueó con caseína durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió PE de scFv a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Tras el lavado, se añadió proteína de antígeno biotinilado al pocillo y se incubó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. A esto le siguió la incubación con el conjugado estreptavidina-HRP durante 1 h a temperatura ambiente. La actividad HRP se detectó con sustrato TMB y la reacción se extinguió con HCl 2 M. Las placas se leyeron a 450 nm. Se seleccionaron los clones que presentaban una señal de densidad óptica (DO) a 450 nm superior a la del clon parental y se volvieron a analizar mediante ELISA (tal como se describió anteriormente) por duplicado para confirmar los resultados positivos. Se secuenciaron los clones que presentaban repetidamente una señal superior a la del anticuerpo parental. A continuación, se determinó la concentración de proteína scFv de cada clon que tenía un cambio de CDR mediante un ELISA de scFv cuantitativo, en el que se utilizó como referencia un scFv con concentración conocida. La concentración de proteína scFv se determinó comparando las señales de ELISA con las señales generadas por el scFv de referencia. El ensayo de unión se repitió una vez más para todas las variantes positivas con una concentración de scFv normalizada, con el fin de determinar la afinidad de unión relativa del scFv mutante y el anticuerpo parental.

Las mutaciones puntuales en VH y VL que se determinó que eran beneficiosas para la unión al antígeno se combinaron posteriormente para obtener una sinergia de unión adicional. Los mutantes combinatorios se expresaron como scFv y se analizaron utilizando ELISA de captura. Se secuenciaron los clones que presentaban una señal de DO a 450 nm superior a la del clon parental y posteriormente se confirmaron mediante ELISA de unión tal como se describió anteriormente.

Tras la maduración por afinidad, se obtuvieron un total de 10 anticuerpos humanizados (2E5, 2G4, 1G10, 2C2, 2B1, 8C10, 1H6, 5C4, A6W y L1I). La figura 2 muestra el resultado de la primera ronda de cribado de biblioteca de mutagénesis. En la tabla 5 se muestran los datos de secuencia y afinidad de 10 anticuerpos humanizados en seres humanos, macacos cangrejeros y ratones.

La tabla 5 muestra el resultado de la segunda ronda de mutagénesis. Los clones 1H6, 2E5, 2G4 y 2C2 se seleccionaron para su posterior análisis.

Tabla 5

Nombre	CDR3 de VH	CDR1 de VK	CDR3 de VK	Bmáx (ser humano)	Kd (ser humano)	Bmáx (ratón)	Kd (ratón)	Bmáx (macaco cangrejero)	Kd (macaco cangrejero)
2E5	I	LDSGGTYLYW (SEQ ID NO:25)	MQLTHWPYTFGQ (SEQ ID NO:30)	3,279	0,0675	0,4696	0,0443	1,72	0,1088
2G4	I	LDSGGTYLYW (SEQ ID NO:26)	MQLTHWPYTFGQ (SEQ ID NO:30)	3,371	0,0708	0,4793	0,0426	1,718	0,1057
1G10	L	LDSGGTYLYW (SEQ ID NO:27)	MQLTHWPYTFGQ (SEQ ID NO:30)	2,600	0,0711	0,2997	0,0718	1,082	0,1224

2C2	I	LDSDGATYLYW (SEQ ID NO:27)	MLTHWPYTFGQ (SEQ ID NO:30)	3,175	0,082	0,416	0,049	1,668	0,116
2B1	I	LDSDGNTYLYW (SEQ ID NO:28)	MLTHWPYTFGQ (SEQ ID NO:30)	3,019	0,0912	0,3393	0,0346	1,207	0,1142
8C10	I	LDSDGQTYLYW (SEQ ID NO:29)	MLTHENYTFGQ (SEQ ID NO:31)	2,307	0,104	0,437	0,038	1,109	0,280
1H6	L	LDSDGGTYLYW (SEQ ID NO:25)	MLTHWPYTFGQ (SEQ ID NO:30)	3,348	0,1114	0,2213	0,0466	0,3171	0,0977
5C4	L	LDSDGQTYLYW (SEQ ID NO:29)	MLTHEPYTFGQ (SEQ ID NO:32)	2,649	0,236	0,164	0,027	0,258	0,292
A6W	L	LDSDGNTYLYW (SEQ ID NO:28)	MLTHWPYTFGQ (SEQ ID NO:30)	2,571	0,2885	0,1736	0,0294	0,0787	0,0016
L1I	I	LDSDGNTYLYW (SEQ ID NO:28)	MLTHAPYTFGQ (SEQ ID NO:33)	1,048	1,8370	0,1048	0,0050	0,05175	N/A

4. Purificación de anticuerpos

El vector que contenía el anticuerpo humanizado madurado por afinidad se transfectó en células 293F para la producción y expresión del anticuerpo. Los anticuerpos presentes en el sobrenadante de las células 293F se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

5. Ejemplo 4: Caracterización del anticuerpo humanizado

1. Reactividad cruzada con PD-1 humana, de macaco cangrejero y de ratón (entre especies)

1.1. FACS

La reactividad cruzada se midió mediante FACS y ELISA. Para FACS, se sometió a prueba la unión de los anticuerpos anti-PD-1 a PD-1 humana, de ratón y de macaco cangrejero de superficie celular tal como se describe en el ejemplo 2.3.

La figura 3 muestra los resultados de la prueba entre especies mediante FACS. La figura 3A muestra la unión a células CHO-S transfectadas con PD-1 humana. Los anticuerpos pueden unirse específicamente a la PD-1 humana con una CE50 de 2,20-2,78 nM. La figura 3B muestra la unión a células 293F transfectadas con PD-1 de ratón. Los anticuerpos pueden unirse específicamente a la PD-1 de ratón con una CE50 de 11,8-15,1 nM. La figura 3C muestra la unión a PBMC de macaco cangrejero activadas de manera dependiente de la dosis. El isotipo fue IgG4 kappa humana. Lo mismo a continuación.

1.2. Reactividad cruzada con PD-1 humana, de macaco cangrejero y de ratón (entre especies)

Para ELISA, las placas (Nunc) se recubrieron con PD-1 humana, de macaco cangrejero o de ratón (Sino Biological) a 1 µg/ml durante la noche a 4 °C. Tras el bloqueo y el lavado, los anticuerpos se diluyeron en serie en tampón de bloqueo y se añadieron a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se lavaron las placas y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP (Bethyl) durante 1 h. Tras el lavado, se añadió sustrato TMB y se detuvo la reacción con HCl 2 M. La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices).

La figura 4 muestra el resultado de la prueba entre especies mediante ELISA. La figura 4A muestra la unión a PD-1 humana. La figura 4B muestra la unión a PD-1 de ratón. La figura 4C muestra la unión a PD-1 de macaco cangrejero.

2. Reactividad cruzada con los miembros CD28, CTLA4 de la familia de PD-1 humana

Las líneas celulares construidas que expresan respectivamente PD-1, CD28, CTLA-4 o ICOS de ser humano se transfirieron en placas de 96 pocillos con fondo en U (BD) a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Los anticuerpos de prueba se diluyeron en tampón de lavado (1×PBS/BSA al 1 %) y se incubaron con las células a 4 °C durante 1 h. Tras el lavado, se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-Fc de IgG humana conjugado con FITC (Jackson ImmunoResearch Lab) y se incubó a 4 °C en la oscuridad durante 1 h. A continuación, las células se lavaron una vez y se resuspendieron en 1×PBS/BSA al 1 %, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD) y el software FlowJo.

La figura 5 muestra el resultado de la prueba entre familias. Los anticuerpos anti-PD-1 pueden unirse específicamente a PD-1 humana, pero no a CD28 ni a CTLA-4.

3. Bloqueo de la unión del ligando a PD-1

3.1. La capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 para bloquear la unión de PD-L1 a PD-1 se sometió a prueba mediante FACS tal como se describe en el ejemplo 2.3.

3.2. La capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 para bloquear la unión de PD-L2 a PD-1 se sometió a prueba mediante ELISA. Brevemente, las placas (Nunc) se recubrieron con PD-1 humana a 1 µg/ml durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos se diluyeron en serie en tampón de bloqueo y se mezclaron con PD-L2 conjugado con etiqueta His. Tras el bloqueo y el lavado de las placas recubiertas, se añadió a las placas la mezcla de anticuerpo/PD-L2, luego se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación se lavaron las placas y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-His conjugado con HRP (GenScript) durante 1 h. Tras el lavado, se añadió sustrato TMB y se detuvo la reacción con HCl 2 M. La absorbancia a 450 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices).

La figura 6A muestra el resultado de anticuerpos anti-PD-1 que bloquean la unión de PD-L1 humano a células CHO-S transfectadas con PD-1. La figura 6B muestra el resultado de anticuerpos anti-PD-1 que bloquean la unión de PD-L1 de ratón a células 293F transfectadas con PD-1. La figura 7 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 pueden bloquear la unión de PD-L2 humano a PD-1 de manera dependiente de la dosis.

4. Afinidad de unión cinética completa sometida a prueba mediante resonancia de plasmón superficial (SPR)

Los anticuerpos se caracterizaron por afinidad y cinética de unión a PD-1 mediante ensayo de SPR utilizando ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Se inmovilizó proteína A (Sigma) en un chip sensor GLM (Bio-Rad) mediante acoplamiento de amina. Los anticuerpos purificados se hicieron fluir a lo largo del chip sensor y se capturaron por la proteína A. El chip se giró 90° y se lavó con tampón de desarrollo (1×PBS/Tween20 al 0,01 %, Bio-Rad) hasta que se estabilizó la línea de base. Se hicieron fluir siete concentraciones de PD-1 humana y tampón de desarrollo a través del chip sensor a una velocidad de flujo de 30 µl/min para una fase de asociación de 180 s, seguida de una disociación de 300 s. Tras la regeneración, se hicieron fluir siete concentraciones de PD-1 de ratón y tampón de desarrollo a través del chip sensor a un caudal de 30 µl/min durante una fase de asociación de 180 s, seguida de una disociación de 300 s. El chip se regeneró con H₃PO₄ pH 1,5 después de cada desarrollo. La curva de asociación y disociación se ajustó mediante el modelo de unión de Langmuir 1:1 utilizando el software ProteOn.

Las tablas 6A-6B muestran los resultados de la afinidad de unión cinética completa a PD-1 humana y de ratón mediante SPR. WBP305BMK1 se sintetizó según el clon de 5C4 de la patente US9084776B2 de BMS. Keytruda era el fármaco anti-PD-1 de Merck. Lo mismo a continuación. Los resultados muestran que la capacidad de afinidad por PD-1 humana mediante ensayo de SPR fue de 1,43E-8 a 5,64E-9 mol/l. Comparando WBP305BMK1 con Keytruda, el valor de K_D del anticuerpo 2E5, 2G4 o 2C2 era mucho menor, lo que ilustra que 2E5, 2G4 o 2C2 tenía mejor capacidad de unión a PD-1 humana. Además, la capacidad de afinidad por PD-1 de ratón fue de 9,37E-9 a 3,89E-9 mol/l.

Tabla 6A

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi² (RU²)	Valor de U
hPD-1.His	1H6	6,44E+05	9,18E-03	1,43E-08	0,05	1
	2E5	5,97E+05	3,66E-03	6,13E-09	0,14	1
	2G4	6,63E+05	4,70E-03	7,09E-09	0,10	1
	2C2	7,33E+05	4,14E-03	5,64E-09	0,03	1
	W3052-16.88.z9-IgG4 (42720)	3,82E+06	1,36E-01	3,56E-08	0,03	5
	WBP305BMK1	4,02E+05	1,35E-03	3,37E-09	0,01	1
	Keytruda	8,79E+05	2,28E-03	2,59E-09	0,07	1

Tabla 6B

Analito	Ligando	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi² (RU²)	Valor de U
mPD-1.His	1H6	3,20E+05	3,00E-03	9,37E-09	0,06	1
	2E5	3,23E+05	1,29E-03	3,99E-09	0,01	1
	2G4	3,34E+05	1,30E-03	3,89E-09	0,01	1
	2C2	2,21E+05	1,53E-03	6,92E-09	0,19	1

	W3052-16.88.z9-IgG4 (42720)	1,95E+05	8,09E-03	4,16E-08	0,01	1
--	-----------------------------	----------	----------	----------	------	---

5. Afinidad de unión de los anticuerpos anti-PD-1 por las moléculas de PD-1 de superficie celular sometida a prueba mediante citometría de flujo (FACS)

Las células CHO-S que expresan PD-1 humana o las células 293F que expresan PD-1 de ratón se transfirieron en placas de 96 pocillos con fondo en U (BD) a una densidad de 1×10^5 células/pocillo. Los anticuerpos de prueba se diluyeron en serie 1:2 en tampón de lavado (1×PBS/BSA al 1 %) y se incubaron con las células a 4 °C durante 1 h. Se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-Fc de IgG humana conjugado con FITC (3,0 moles de FITC por mol de IgG, Jackson ImmunoResearch Lab) y se incubó a 4 °C en la oscuridad durante 1 h. A continuación, las células se lavaron una vez y se resuspendieron en 1×PBS/BSA al 1 %, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD). La intensidad de fluorescencia se convirtió en moléculas unidas/célula basándose en las perlas cuantitativas (Quantum™ MESF Kits, Bangs Laboratories, Inc.). La KD se calculó utilizando Graphpad Prism5.

Las tablas 7A-7B muestran los resultados de la afinidad de unión de los anticuerpos anti-PD-1 por las moléculas de PD-1 humana y de ratón de superficie celular sometidas a prueba mediante citometría de flujo. Los resultados muestran que la capacidad de afinidad por PD-1 humana mediante ensayo de FACS fue de $3,80E-10$ a $2,15E-10$ mol/l. Además, la capacidad de afinidad por PD-1 de ratón fue de $5,39E-8$ a $1,74E-8$ mol/l.

Tabla 7A

Muestra	Mejor ajuste-KD (M)
1H6	2,15E-10
2E5	2,30E-10
2G4	3,80E-10
2C2	2,64E-10
W3052-16.88.z9-IgG4 (42720)	4,32E-10
WBP305BMK1	2,62E-10
Keytruda	1,79E-10

Tabla 7B

Muestra	Mejor ajuste-KD (M)
1H6	5,39E-08
2E5	2,90E-08
2G4	3,51E-08
2C2	1,74E-08
W3052-16.88.z9-IgG4 (42720)	1,67E-08

6. Prueba de agrupación de epítomos

El epítipo de unión de los anticuerpos anti-PD-1 se comparó con el anticuerpo de referencia A y B mediante FACS. Se incubaron células CHO-S que expresan PD-1 humana en la superficie celular con una mezcla de anticuerpo de referencia A o B biotinilado (1 µg/ml) y anticuerpos de prueba (diluidos en serie en tampón de lavado) a 4 °C durante 1 h. Se lavaron las células y se añadió el segundo anticuerpo estreptavidina-PE y se incubaron durante 30 min a 4 °C. A continuación, se lavaron las células una vez y se resuspendieron en 1×PBS/BSA al 1 %, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD).

Las figuras 8A-8B muestran los resultados del ensayo de agrupación de epítomos, lo que sugiere que los anticuerpos

anti-PD-1 se encuentran en el mismo grupo o en un grupo cercano de epítomos que los anticuerpos de referencia. La figura 8A muestra la agrupación frente a WBP305BMK1 (documento US9084776). La figura 8B muestra la agrupación frente a Keytruda (documento US8168757).

Además, se realizaron experimentos de barrido de alanina en hPD-1 y se evaluó su efecto sobre la unión de anticuerpos. Los residuos de alanina en hPD-1 se mutaron a codones de glicina, y todos los demás residuos se mutaron a codones de alanina. Para cada residuo del dominio extracelular (ECD) de hPD-1, se realizaron sustituciones puntuales de aminoácidos mediante dos etapas secuenciales de PCR. Se utilizó como plantilla un plásmido pcDNA3.3-hPD-1_ECD.His que codifica para el ECD de PD-1 humana y una etiqueta His C-terminal, y se utilizó un conjunto de cebadores mutagénicos para la primera etapa de PCR utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange Lightning (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Se utilizó la endonucleasa Dpn I para digerir la plantilla parental tras la reacción de síntesis de la cadena mutante. En la segunda etapa de PCR, se amplificó y expresó transitoriamente en células HEK293F (Life Technologies, Gaithersburg, MD) un casete de expresión de ADN lineal compuesto por un promotor de CMV, un dominio extracelular (ECD) de PD-1, una etiqueta His y una poliadenilación de timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple.

Los anticuerpos monoclonales W3052_r16.88.9 y Keytruda se recubrieron en placas para el ensayo de unión ELISA. Después de interactuar con el sobrenadante que contiene el mutante de PD-1 cuantificado o la proteína PD-1_ECD.His humana/de ratón (Sino Biological, China), se añadió anticuerpo anti-His conjugado con HRP como anticuerpo de detección. La absorbancia se normalizó según el promedio de los mutantes de control. Tras establecer un valor de corte adicional para el cambio en veces de la unión ($<0,55$), se identificaron los residuos epítomados determinados finales.

Se llevaron a cabo las actividades de unión de los anticuerpos W3052_r16.88.9 y Keytruda a PD-1 tanto humana como murina (figura 9). Se observó que W3052_r16.88.9 se unía tanto a hPD-1 como a mPD-1, mientras que Keytruda sólo se unía a PD-1 humana (figura 9). Esta reactividad cruzada funcional singular de W3052_r16.88.9 puede ayudar a proporcionar más opciones de modelos animales en estudios preclínicos a la hora de evaluar la seguridad del fármaco. Para explorar el origen de los comportamientos de unión observados, se realizó un mapeo de epítomos de ambos anticuerpos.

En la tabla 8 se muestran los 30 mutantes de hPD-1 con sustituciones puntuales que redujeron significativamente la unión de anticuerpos. La comprobación de las posiciones de todos estos residuos en las estructuras cristalinas de hPD-1 (código PDB 3RRQ y 4ZQK) reveló que algunos aminoácidos (por ejemplo, Val144, Leu142, Val110, Met108, Cys123, etc.) estaban totalmente enterrados en la proteína, y era improbable que contactaran directamente con ningún anticuerpo. Lo más probable es que las reducciones de unión observadas se debieran a la inestabilidad o incluso al colapso de la estructura de hPD-1 tras las sustituciones de alanina. Según el análisis de la estructura del antígeno, algunos de los residuos no implican actividad de unión, pero se espera que respondan a la estabilidad de la estructura de hPD-1, por ejemplo, V144 y L142. Los mutantes que afectan a ambos anticuerpos se trataron como falsos puntos calientes y se eliminaron de la lista. Tras establecer un valor de corte adicional para el cambio en veces de la unión ($<0,55$), los residuos epítomados determinados finales se enumeraron en la tabla 9. Son 9 posiciones para W3052_r16.88.9 y 5 posiciones para Keytruda.

La comparación de los residuos epítomados de W3052_r16.88.9 y Keytruda en la tabla 9 sólo reveló dos residuos de puntos calientes superpuestos. El resto parecía bastante diverso, lo que indicaba que los dos anticuerpos podrían haber adoptado mecanismos muy diferentes en cuanto a la unión de hPD-1 y el bloqueo de hPD-L1. La lectura de las ID de los residuos en la tabla 9 no es sencilla para interpretar los mecanismos. Por tanto, todos los datos de la tabla 9, así como el sitio de unión de hPD-L1, se mapearon en la estructura cristalina de hPD-1 para realizar una mejor visualización y comparación (figura 10).

Tabla 8. Efecto de las mutaciones puntuales de PD-1 sobre la unión de anticuerpos

N.º de residuo de PD-1	W3052_r16.88.9		N.º de residuo de PD-1	Keytruda	
	cambio en veces ^a	DE		cambio en veces ^a	DE
<u>V 144</u>	0,09	0,01	P 89	0,18	0,02
<u>L 142</u>	0,21	0,01	D 85	0,38	0,01
K 131	0,27	0,02	<u>V 144</u>	0,4	0,01
P 35	0,31	0	<u>R 94</u>	0,46	0,04
A 129	0,34	0	<u>F 106</u>	0,47	0,05
V 64	0,34	0	K 78	0,48	0

P 83	0,38	0,03	P 83	0,5	0,01
L 128	0,39	0,01	D 92	0,5	0,02
<u>S 137</u>	0,42	0,01	<u>P 39</u>	0,54	0
<u>F 95</u>	0,42	0,01	A 81	0,57	0,01
P 130	0,44	0,01	<u>C 123</u>	0,57	0,01
<u>C 123</u>	0,44	0,01	N 66	0,57	0,03
<u>R 94</u>	0,49	0,04	<u>L 142</u>	0,59	0,01
<u>M 108</u>	0,49	0,02	F 82	0,61	0,03
<u>D 117</u>	0,51	0,01	<u>F 95</u>	0,61	0,04
F 82	0,53	0,02	<u>F 52</u>	0,63	0,01
A 132	0,54	0,02	<u>M 108</u>	0,64	0,06
<u>V 110</u>	0,54	0,02	L 128	0,68	0,01
<u>N 49</u>	0,55	0,01	I 126	0,72	0,01
<u>W 67</u>	0,55	0,01	<u>A 113</u>	0,72	0,01
E 61	0,56	0,04	<u>V 110</u>	0,73	0,04
N 102	0,57	0,04	G 47	0,73	0,01
<u>P 39</u>	0,57	0,01	<u>D 117</u>	0,73	0,07
I 126	0,59	0,04	N 49	0,73	0
<u>A 113</u>	0,6	0,01	S 87	0,74	0,06
<u>F 52</u>	0,61	0,02	L 42	0,76	0,01
H 155	0,62	0,04	N 102	0,76	0,01
R 86	0,64	0,08	W 67	0,81	0,01
A 149	0,64	0	P 101	0,81	0,04
G 47	0,64	0,03	A 80	0,82	0,01

^a El cambio en veces en la unión es relativo a la unión de varias sustituciones silenciosas de alanina.

Tabla 9. Identificación de posibles epítomos

PD-1 para r16.88.9	ubicación de residuo	PD-1 para Keytruda	ubicación de residuo
P 35	A	K 78	C'
V 64	C	P 83	C'
F 82	C'	D 85	C"
P 83	C'	P 89	C"
L 128	FG	D 92	C"D
A 129	FG		
P 130	FG		
K 131	FG		
A 132	FG		

Valor de corte: cambio en veces <0,55

* La cadena C" observada en mPD-1 no existe en la estructura de hPD-1. Esta lámina β se sustituye por un bucle sin estructura en hPD-1. Se sigue utilizando C" para marcar esta región, sólo con el propósito de facilitar la comparación con mPD-1.

Los dos anticuerpos investigados, W3052_r16.88.9 y Keytruda, aunque son ambos funcionales en la unión de hPD-1 y el bloqueo de hPD-L1, tienen epítomos obviamente diferentes (figuras 10B, 10C). Al epítomo de Keytruda contribuyeron principalmente los residuos del bucle C'D (correspondiente a la cadena C" de mPD-1), que no se cruzaban con el sitio de unión de PD-L1 en absoluto. Esto sugería que la función de bloqueo de hPD-L1 de Keytruda dependía más de sus efectos de impedimento estérico proporcionados por el tamaño del anticuerpo. Por el contrario, los resultados del mapeo de epítomos muestran que el epítomo del anticuerpo W3052_r16.88.9 estaba compuesto por puntos calientes distribuidos en múltiples ubicaciones, y se solapaban directamente con el sitio de unión de hPD-L1 (figuras 10A, 10B). W3052_r16.88.9 bloqueó hPD-L1 al competir con hPD-L1 en la reacción con su sitio de unión común. Es más, W3052_r16.88.9 no tenía interacciones con el bucle C'D flexible (o la cadena C"

correspondiente en mPD-1), donde PD-1 humana y murina muestran grandes desviaciones estructurales (figura 11). Su sitio de unión se ubica principalmente en el bucle FG (*Lin et al. (2008) PNAS 105: 3011-3016*). Esto explica por qué W3052_r16.88.9 puede unirse a ambas especies de PD-1, mientras que Keytruda sólo se une a la especie humana (figura 9). Debido a esta reactividad cruzada funcional singular, las evaluaciones preclínicas de seguridad de W3052_r16.88.9 podrían realizarse en un modelo de ratón, lo que simplificaría y aceleraría enormemente el desarrollo. En general, se espera que el anticuerpo W3052_r16.88.9 sea más funcional y desarrollable que Keytruda.

7. Función *in vitro* de los anticuerpos anti-PD-1 sometida a prueba mediante ensayos basados en células

7.1. Se utilizó la reacción linfocitaria mixta (MLR) para someter a prueba los efectos de los anticuerpos anti-PD-1 sobre la función de los linfocitos T

Aislamiento de células DC, T CD4⁺, T CD8⁺ y T totales humanas: las PBMC humanas se había aislado recientemente de donantes sanos mediante centrifugación por gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE). Los monocitos se aislaron utilizando el kit de enriquecimiento de monocitos humanos (StemCell) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se cultivaron en medio que contenía rhGM-CSF y rhIL-4 durante de 5 a 7 días para generar células dendríticas. De 18 a 24 horas antes de la MLR, se añadió 1 µg/ml de LPS al cultivo para inducir la maduración de las DC. Las células T CD4⁺ humanas se aislaron utilizando el kit de enriquecimiento de células T CD4⁺ humanas (StemCell) según el protocolo del fabricante. Las células T CD4⁺ de ratón se obtuvieron del bazo de un ratón *Balb/c* utilizando el kit de aislamiento de células T CD4⁺ de ratón (StemCell) según el protocolo del fabricante. Las DC de ratón se indujeron a partir de células de médula ósea de ratón C57BL/6 en medio que contenía rmGM-CSF y rmlL-4 durante de 5 a 7 días. De 18 a 24 horas antes de la MLR, se añadió 1 µg/ml de LPS al cultivo para inducir la maduración de las DC.

Brevemente, la MLR estimulada por células dendríticas (DC) primarias se llevó a cabo en placas de histocultivo de 96 pocillos y fondo en U en 200 µl de RPMI 1640 con un FCS al 10 % y antibióticos al 1 %. Las DC se mezclaron con 1×10⁵ células T CD4⁺ a razón DC:células T de entre 1:10 y 1:200 en presencia o ausencia de anticuerpos de prueba o anticuerpos de referencia (desde 166,75 nM hasta 0,00667 nM, en general un total de seis concentraciones). Para determinar el efecto de los anticuerpos anti-PD-1 sobre la función de las células T, se determinó la producción de citocinas y la proliferación de células T. Los resultados mostrados son representativos de un mínimo de cinco experimentos realizados.

Detección de citocinas: se midieron IFN-γ e IL-2 de ser humano mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) utilizando pares de anticuerpos emparejados. Las placas se recubrieron previamente con anticuerpos de captura específicos para IFN-γ (n.º de cat. Pierce-M700A) o IL-2 (n.º de cat. R&D-MAB602) de ser humano, respectivamente. Como anticuerpo detector se utilizó el anticuerpo anti-IFN-γ (n.º de cat. Pierce-M701B) o el anticuerpo anti-IL-2 (n.º de cat. R&D-BAF202) conjugado con biotina.

La figura 12A muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la secreción de IL-2 de manera dependiente de la dosis. La figura 12B muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la secreción de IFN-γ de manera dependiente de la dosis.

Ensayo de proliferación: se diluyó 1:20 3H-timidina (n.º de cat. PerkinElmer-NET027001MC) en disolución de NaCl al 0,9 %, y se añadió a las placas de cultivo celular a 0,5 uCi/pocillo. Las placas se cultivaron en el 5 % de CO₂ a 37 °C durante de 16 a 18 horas, antes de determinar la incorporación de 3H-timidina en las células proliferantes. La figura 12C muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la proliferación de células T CD4⁺ de manera dependiente de la dosis.

Para determinar el efecto de los anticuerpos anti-PD-1 sobre la función de las células T de ratón, se determinaron de manera similar la producción de citocinas y la proliferación de células T de ratón. En las figuras 13A-13C se muestran los resultados de la alo-MLR de ratón que demuestran que los anticuerpos anti-PD-1 pueden potenciar la función de las células T CD4⁺ de ratón. La figura 13A muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentaron la secreción de IL-2 de manera dependiente de la dosis. La figura 13B muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentaron la secreción de IFN-γ de manera dependiente de la dosis. La figura 13C muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentaron la proliferación de células T CD4⁺ de manera dependiente de la dosis.

7.2. Efecto de los anticuerpos anti-PD-1 humanos sobre la proliferación celular y la producción de citocinas mediante la respuesta inmunitaria específica de antígenos autólogos

En este ensayo, las células T CD4⁺ y las DC procedían de un mismo donante. Brevemente, las células T CD4⁺ se purificaron a partir de PBMC y se cultivaron en presencia del péptido pp65 de CMV y una dosis baja de IL-2 (20 U/ml), mientras que las DC se generaron cultivando monocitos a partir de PBMC del mismo donante en GM-CSF e IL-4. Después de 5 días, las células T CD4⁺ tratadas con péptido pp65 de CMV se cultivaron conjuntamente con DC pulsadas con péptido pp65 de CMV en ausencia o presencia de anticuerpos anti-PD-1 humanos o anticuerpos de referencia (como control). El día 5, se tomaron 100 µl de sobrenadantes de cada uno de los cultivos para la medición de IFN-γ mediante ELISA tal como se describió anteriormente. La proliferación de células T específicas de pp65 de CMV se evaluó mediante la incorporación de 3H-timidina tal como se describió anteriormente.

Las figuras 14A-14B muestran los resultados de la auto-MLR humana que demuestran que los anticuerpos anti-PD-1 pueden potenciar la función de las células T CD4⁺ humanas. La figura 14A muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la secreción de IFN- γ de manera dependiente de la dosis. La figura 14B muestra que los anticuerpos anti-PD-1 aumentan la proliferación de células T CD4⁺ de manera dependiente de la dosis.

5 7.3. Efecto de los anticuerpos anti-PD-1 humanos sobre la función supresora de células T reguladoras (Treg)

Las células Treg, una subpoblación de células T, son un inmunomodulador clave y desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la autotolerancia. Se ha observado un aumento del número de Treg CD4⁺ CD25⁺ en pacientes con múltiples cánceres y se ha asociado a un peor pronóstico. Para determinar si los anticuerpos anti-PD-1 afectan a la función inmunosupresora de las Treg, se comparó la función de las células T en presencia de Treg con o sin tratamiento con anticuerpos anti-PD-1. Las células T CD4⁺ CD25⁺ y CD4⁺ CD25⁻ se separaron utilizando microperlas anti-CD25 específicas (StemCell) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron 2.000 DC maduras, 1×10⁵ células T CD4⁺ CD25⁻, 1×10⁵ células Treg y anticuerpos PD-1 en placas de 96 pocillos. Las placas se mantuvieron a 37 °C en una incubadora con el 5 % de CO₂ durante 5 días. La producción de IFN- γ y la proliferación de células CD4⁺ CD25⁻ se sometieron a prueba tal como se describió anteriormente.

La figura 15 demuestra que los anticuerpos anti-PD-1 pueden revertir la función supresora de las Treg. La figura 15A muestra que los anticuerpos anti-PD-1 pueden restablecer la secreción de IFN- γ . La figura 15B muestra que los anticuerpos anti-PD-1 pueden restablecer la proliferación de células T.

8. Prueba de ADCC y CDC

PD-1 se expresa en diversos tipos de células. Con el fin de minimizar la posible toxicidad para las células positivas para PD-1 sanas, se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

8.1. Prueba de ADCC

Las células T CD4⁺ humanas activadas y diversas concentraciones de anticuerpos PD-1 se incubaron previamente en una placa de 96 pocillos durante 30 minutos y, a continuación, se añadieron PBMC a razón efectora/diana de 50:1. La placa se mantuvo a 37 °C en una incubadora con el 5 % de CO₂ durante 6 horas. La lisis de las células diana se determinó mediante un kit de detección de citotoxicidad basado en LDH (n.º de cat. Roche-11644793001). La absorbancia a 492 nm se leyó utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices). La lisis de células SK-Br-3 inducida por Herceptin se utilizó como control positivo.

La figura 16 muestra el resultado de la prueba de ADCC que demuestra que los anticuerpos anti-PD-1 no mediaron en la actividad de ADCC en las células T CD4⁺ activadas.

8.2. Prueba de CDC

Las células T CD4⁺ humanas activadas y diversas concentraciones de anticuerpos PD-1 se mezclaron en una placa de 96 pocillos. Se añadió complemento humano (Quidel-A112) a razón de dilución de 1:50. La placa se mantuvo a 37 °C en una incubadora con el 5 % de CO₂ durante 2 horas. La lisis de las células diana se determinó mediante CellTiter-Glo. La lisis de células Raji inducida por Rituxan® se utilizó como control positivo. La luminiscencia se leyó utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices).

La figura 17 muestra el resultado de la prueba de CDC que demuestra que los anticuerpos anti-PD-1 no mediaron en la actividad de CDC en las células T CD4⁺ activadas.

Ejemplo 5: Tratamiento de un modelo tumoral *in vivo* utilizando anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1

1. Diseño experimental

Tabla 10. Agrupamiento y pauta posológica de los experimentos de eficacia animal *in vivo* del anticuerpo 2E5

grupo	N ¹	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Parámetros dosis-volumen (μ l/g) ²	Vía de administración	Frecuencia de administración
1	6	Vehículo	--	10	I.P.	Q3D×5
3	6	2E5	1 mg/kg	10	I.P.	Q3D×5

4	6	2E5	3 mg/kg	10	I.P.	Q3D×5
5	6	2E5	10 mg/kg	10	I.P.	Q3D×5

Anotaciones:

¹N: número de ratones en cada grupo

²Dosis-volumen: 10 µl/g según el peso del ratón. Si la pérdida de peso supera el 15 %, la pauta posológica debe ajustarse en consecuencia.

5 2. Métodos

2.1. Cultivo celular

Las células de melanoma murino CloudmanS91 (ATCC-CCL-53.1) se cultivaron *in vitro* como monocapa, y las condiciones de cultivo fueron medio F-12K más FBS al 2,5 % y suero de caballo al 15 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina, incubadas a 37 °C y el 5 % de CO₂. Las células se digirieron utilizando tripsina-EDTA y se hicieron pasar dos veces por semana de manera rutinaria. Se recogieron las células, se contaron, y luego se inocularon cuando alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80 %-90 % y el número era el requerido.

2.2. Inyección de células tumorales

Se inocularon 0,1 ml de células CloudmanS91 (5×10⁵ células) por vía subcutánea en el dorso derecho de cada animal. Cuando la media del volumen tumoral había alcanzado aproximadamente 64 mm³, se inició la administración en los grupos. El agrupamiento y las pautas posológicas se muestran en la tabla 10.

2.3. Índice y pruebas tumorales

El índice experimental consiste en investigar si se inhibió, retrasó o curó el crecimiento tumoral. Los diámetros del tumor se midieron con un calibre tres veces por semana. El volumen tumoral se calcula utilizando $V=0,5a \times b^2$, donde *a* y *b* representan los diámetros largo y corto del tumor, respectivamente.

La eficacia antitumoral del anticuerpo se evaluó mediante la inhibición del crecimiento tumoral, TGI (%), o la tasa de proliferación tumoral relativa, T/C (%). La TGI (%) reflejaba la tasa de inhibición del crecimiento tumoral. La TGI (%) se calculó de la siguiente manera: $TGI (\%) = [(1 - (\text{volumen tumoral promedio al final de la administración en el grupo de tratamiento} - \text{volumen tumoral promedio al inicio de la administración en el grupo de tratamiento})) / (\text{volumen tumoral promedio al final del tratamiento en el grupo de control de disolvente} - \text{volumen tumoral promedio al inicio del tratamiento en el grupo de control de disolvente})] \times 100 \%$.

La tasa de proliferación tumoral relativa, T/C (%), se calculó de la siguiente manera: $T/C (\%) = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100 \%$ (T_{RTV}: RTV del grupo de tratamiento; C_{RTV}: RTV del grupo de control negativo). El volumen tumoral relativo (RTV) se calculó según los resultados de las mediciones tumorales utilizando $RTV=V_t/V_0$, donde V₀ era el volumen tumoral promedio en el momento del agrupamiento (es decir, d₀), V_t era el volumen tumoral promedio de una determinada medición; los datos de T_{RTV} y C_{RTV} se tomaron el mismo día.

T-C (días) reflejaba el índice de retraso del crecimiento tumoral, T representaba el promedio de días transcurridos cuando el tumor había alcanzado un volumen predeterminado en el grupo de tratamiento (por ejemplo, 300 mm³), C representaba el promedio de días en que los tumores del grupo de control habían alcanzado el mismo volumen.

Se representaron gráficamente curvas de supervivencia; el tiempo de supervivencia de los animales se definió como el tiempo transcurrido desde la administración hasta la muerte de los animales o el momento en que el volumen tumoral había alcanzado 2000 mm³. Se calculó la mediana del tiempo de supervivencia (días) en cada grupo. La esperanza de vida aumentada (ILS) se calculó comparando la mediana de los tiempos de supervivencia entre el grupo tratado y el grupo de control modelo y se representó como un porcentaje a lo largo de la vida del grupo de control modelo.

40 2.4. Análisis estadístico

Se analizaron estadísticamente los datos, incluyendo el volumen tumoral promedio en cada punto de tiempo de cada grupo y el error estándar (EEM) (véanse los datos específicos en la tabla 11). El experimento se completó el día 37 después de la administración; el día 13 después de la administración, se comenzó a sacrificar animales sucesivamente; y, por tanto, el análisis estadístico y la evaluación de las diferencias entre grupos se basaron en el volumen tumoral el día 13 después del inicio de la administración. Para las comparaciones entre los dos grupos, los

datos se analizaron utilizando la prueba de la T; para las comparaciones entre tres o más grupos, los datos se analizaron utilizando ANOVA unifactorial. Si se encontraba una diferencia estadísticamente significativa en el valor de F, los datos se analizaban utilizando la prueba de Games-Howell. Si no se encontraban diferencias estadísticamente significativas en el valor de F, entonces se utilizó la prueba de Dunnet (bilateral) para el análisis. Se utilizó SPSS 17.0 para todos los análisis de datos. $p < 0,05$ se consideró una diferencia significativa. El tiempo de supervivencia se analizó utilizando el método de Kaplan-Meier con la prueba de rangos logarítmicos.

3. Resultados

3.1. Mortalidad, morbilidad y cambios en el peso corporal

El peso del animal es una referencia indirecta para medir la toxicidad del fármaco. El impacto de 2E5 en el peso del modelo de ratón DBA/2 hembra de xenoinjerto singénico subcutáneo CloudmanS91 se muestra en la figura 18 y la figura 19. En este modelo, ninguno de los grupos de administración mostró ninguna pérdida de peso significativa (figura 18). Por tanto, 2E5 no presentó toxicidad evidente en un modelo de ratón de melanoma CloudmanS91.

3.2. Volumen tumoral

El volumen tumoral en el modelo de ratón DBA/2 hembra de xenoinjerto singénico subcutáneo CloudmanS91 tras el tratamiento con 2E5 fue tal como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Volumen tumoral a diferentes tiempos en cada grupo

Días	Volumen tumoral (mm ³) ^a			
	Vehículo	2E5 1 mg/kg	2E5 3 mg/kg	2E5 10 mg/kg
0 ^b	66 ± 9	65 ± 8	64 ± 8	63 ± 8
2	142 ± 23	129 ± 10	110 ± 10	94 ± 8
4	251 ± 39	231 ± 34	162 ± 9	143 ± 17
6	345 ± 65	339 ± 61	200 ± 13	197 ± 38
9	599 ± 66	597 ± 100	281 ± 38	291 ± 83
11	1.026 ± 173	943 ± 307	335 ± 66	475 ± 190
13	1.626 ± 262	1.089 ± 365	361 ± 81	614 ± 273

Anotaciones:

a. promedio ± EEM;

b. Días después de la administración.

3.3. Curva de crecimiento tumoral

La curva de crecimiento tumoral se muestra en la figura 20.

3.4. Evaluación de la eficacia antitumoral

Tabla 12. Evaluación de la eficacia antitumoral de 2E5 en el modelo de tumor singénico CloudmanS91 (basado en el volumen tumoral en el día 13 tras el inicio de la administración)

grupo	Volumen tumoral (mm ³) ^a (día 13)	T/C ^b (%)	TGI ^b (%)	T-C (días) (300 mm ³)	Valor de p ^c
Vehículo	1.626 ± 262	--	--	--	--
2E5 (1 mg/kg)	1.089 ± 365	68,1	34,4	0	0,367

2E5 (3 mg/kg)	361 ± 81	22,9	81,0	5	0,008
2E5 (10 mg/kg)	614 ± 273	39,4	64,7	5	0,036

Anotaciones:

a. promedio ± EEM;

b. La inhibición del crecimiento tumoral se calculó mediante T/C y TGI ($TGI (\%) = [1 - (T_{13} - T_0) / (V_{13} - V_0)] \times 100$);

c. El valor de p se calculó mediante el volumen tumoral.

5 3.5. Curvas de supervivencia

Las curvas de supervivencia de cada grupo se muestran en la figura 21.

3.6. Tiempo de supervivencia

Tabla 13. Efecto de 2E5 sobre la supervivencia del modelo de tumor singénico CloudmanS91

grupo	Mediana del tiempo de supervivencia (días)	Supervivencia prolongada (%)	Rangos logarítmicos Valor de p ^a
Vehículo	16	--	--
2E5, 1 mg/kg	20	25	0,077
2E5, 3 mg/kg	N/A ^b	N/A	0,001
2E5, 10 mg/kg	32	100	0,022

Anotaciones:

10 a. El valor de p representa la comparación entre el grupo de tratamiento y el grupo de control de vehículo;

b. Al final del experimento, en el grupo de 3 mg/kg (2E5), la tasa de supervivencia fue del 66,7 %.

4. Discusión

15 En este estudio, se ha evaluado la eficacia *in vivo* de 2E5 en el modelo de tumor singénico CloudmanS91. En la tabla 11, la tabla 12 y la figura 20 se muestra el volumen tumoral de cada grupo en diferentes puntos de tiempo, y en la figura 21 y la tabla 13 se muestra el tiempo de supervivencia. El día 13 después de la administración, el volumen tumoral de los ratones portadores de tumores en el grupo de control de disolvente alcanzó 1.626 mm³. Se observó un efecto inhibitor débil en el grupo de 1 mg/kg de 2E5 en comparación con el grupo de control, y el volumen tumoral fue de 1.089 mm³ (T/C=68,1 %, TGI=34,4 %, p=0,367), el retraso del crecimiento tumoral fue de 0 días. Se observó un efecto antitumoral significativo en el grupo de 3 mg/kg de 2E5 en comparación con el grupo de control de disolvente, y el volumen tumoral fue de 361 mm³ (T/C=22,9 %, TGI=81,0 %, p=0,008), el retraso del crecimiento tumoral fue de 5 días. También se observó un efecto antitumoral significativo en el grupo de 10 mg/kg de 2E5 en comparación con el grupo de control de disolvente, el volumen tumoral fue de 614 mm³ (T/C=39,4 %, TGI=64,7 %, p=0,036), el retraso del crecimiento tumoral fue de 5 días.

25 En el experimento, la mediana del tiempo de supervivencia de los ratones portadores de tumores en el grupo de control de disolvente fue de 16 días. En comparación con el grupo de control de vehículo, la mediana del tiempo de supervivencia de los ratones portadores de tumores en el grupo de 1 mg/kg de 2E5 fue de 20 días, la supervivencia se prolongó un 25 % (p=0,077); la tasa de supervivencia de los ratones portadores de tumores en el grupo de 3 mg/kg de 2E5 fue del 66,7 % (p=0,001). La mediana del tiempo de supervivencia de los ratones portadores de tumores en el grupo de 10 mg/kg de 2E5 fue de 32 días, la supervivencia se prolongó un 100 % (p=0,022).

30 En la figura 19 se muestran los cambios en el peso corporal de los ratones desnudos. Se ha observado una buena tolerabilidad del fármaco 2E5 en todos los ratones portadores de tumores, y no se observó ninguna pérdida de peso significativa en ninguno de los grupos de tratamiento. En resumen, en este experimento, se mostraron efectos antitumorales significativos tanto en el grupo de 3 mg/kg como en el grupo de 10 mg/kg para el modelo de tumor sinérgico subcutáneo CloudmanS91, que no depende de la dosis. El efecto antitumoral del grupo de 3 mg/kg es mejor que el del grupo de 10 mg/kg.

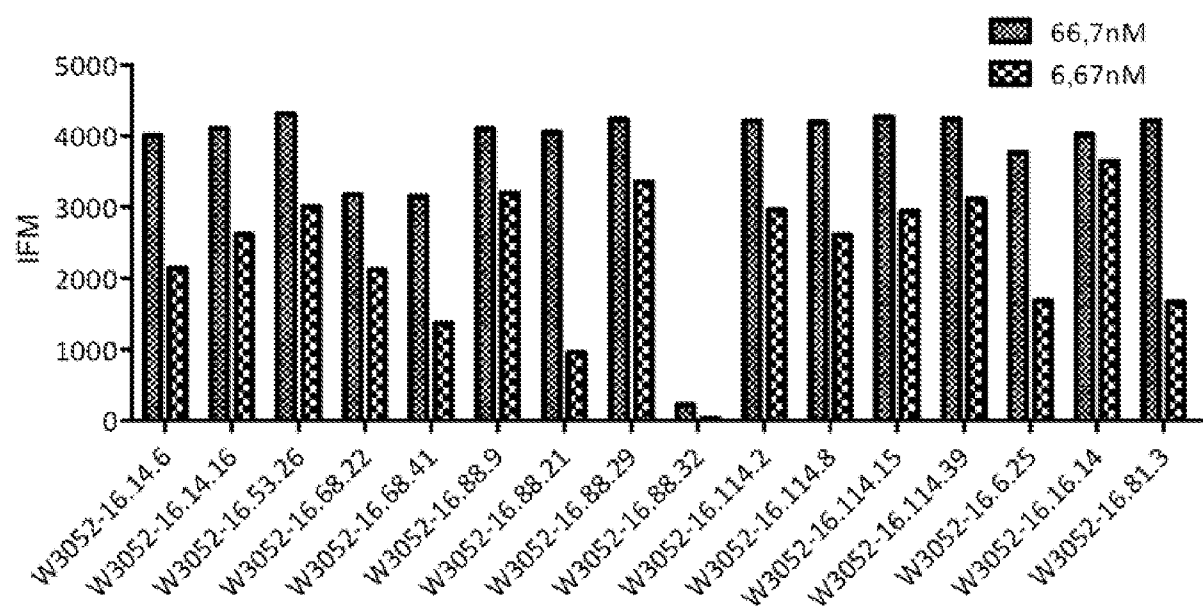
35 La descripción de la presente invención se ha realizado anteriormente mediante los ejemplos. Sin embargo, el experto en la técnica entiende que la presente invención no se limita a los ejemplos. Por tanto, el alcance de la invención se indica en las reivindicaciones adjuntas más que en la descripción anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a PD-1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
 - a) una región variable de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
 - b) una región variable de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
 - c) una región variable de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; o
 - d) una región variable de una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que la PD-1 es PD-1 murina que es PD-1 de ratón o rata.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo
 - a) se une a PD-1 humana con una K_D de $2,15E-10$ M o menos, mediante ensayo de FACS; y
 - b) se une a PD-1 de ratón con una K_D de $1,67E-08$ M o menos, mediante ensayo de FACS; y en el que el anticuerpo presenta al menos una de las siguientes propiedades:
 - c) se une a PD-1 humana con una K_D de entre $4,32E-10$ M y $2,15E-10$ M y a PD-1 de ratón con una K_D de entre $5,39E-08$ M y $1,67E-08$ M, mediante ensayo de FACS;
 - d) no se une específicamente a CD28 humano, CTLA-4;
 - e) aumenta la proliferación de células T;
 - f) aumenta la producción de interferón-gamma en las células T; o
 - g) aumenta la secreción de interleucina-2 en las células T.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en el que el anticuerpo presenta al menos una de las siguientes propiedades:
 - a) se une a PD-1 humana con una K_D de $2,15E-10$ M menos y a PD-1 de ratón con una K_D de $1,67E-08$ M o menos, mediante ensayo de FACS;
 - b) no se une específicamente a CD28 humano, CTLA-4;
 - c) aumenta la proliferación de células T;
 - d) aumenta la producción de interferón-gamma en las células T; o
 - e) aumenta la secreción de interleucina-2 en las células T.
6. Una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo, o el fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector de clonación o expresión que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6.
8. Una célula huésped que comprende uno o más vectores de clonación o expresión según la reivindicación 7.
9. Un procedimiento para la producción del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 8 y aislar el anticuerpo; en el que, preferiblemente, el anticuerpo se prepara mediante inmunización en rata SD con dominio extracelular de PD-1 humana y dominio extracelular de PD-1 de ratón.
10. Un ratón transgénico que comprende transgenes de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana, en el que el ratón expresa el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

11. Un hibridoma preparado a partir del ratón según la reivindicación 10, en el que el hibridoma produce dicho anticuerpo.
12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y uno o más de un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
13. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, unido a un agente terapéutico.
14. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado según la reivindicación 13 y un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
15. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en un método para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno inmunitario o cáncer.
16. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 15, en un método de tratamiento o profilaxis del cáncer mediante la inhibición del crecimiento de células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo para inhibir el crecimiento de las células tumorales de un cáncer.
17. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 16, en el que el cáncer se selecciona de un grupo que consiste en melanoma, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, y cáncer de recto.
18. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 16 o 17, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

A



B

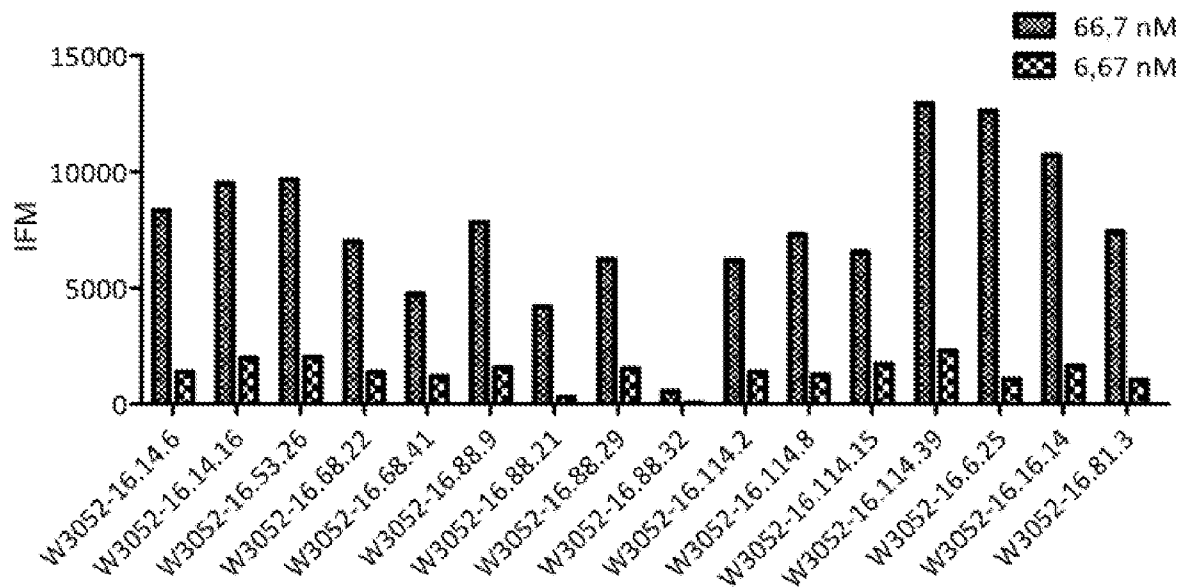


Figura 1

KD de WBP3052 de resultados positivos de la primera ronda de cribado

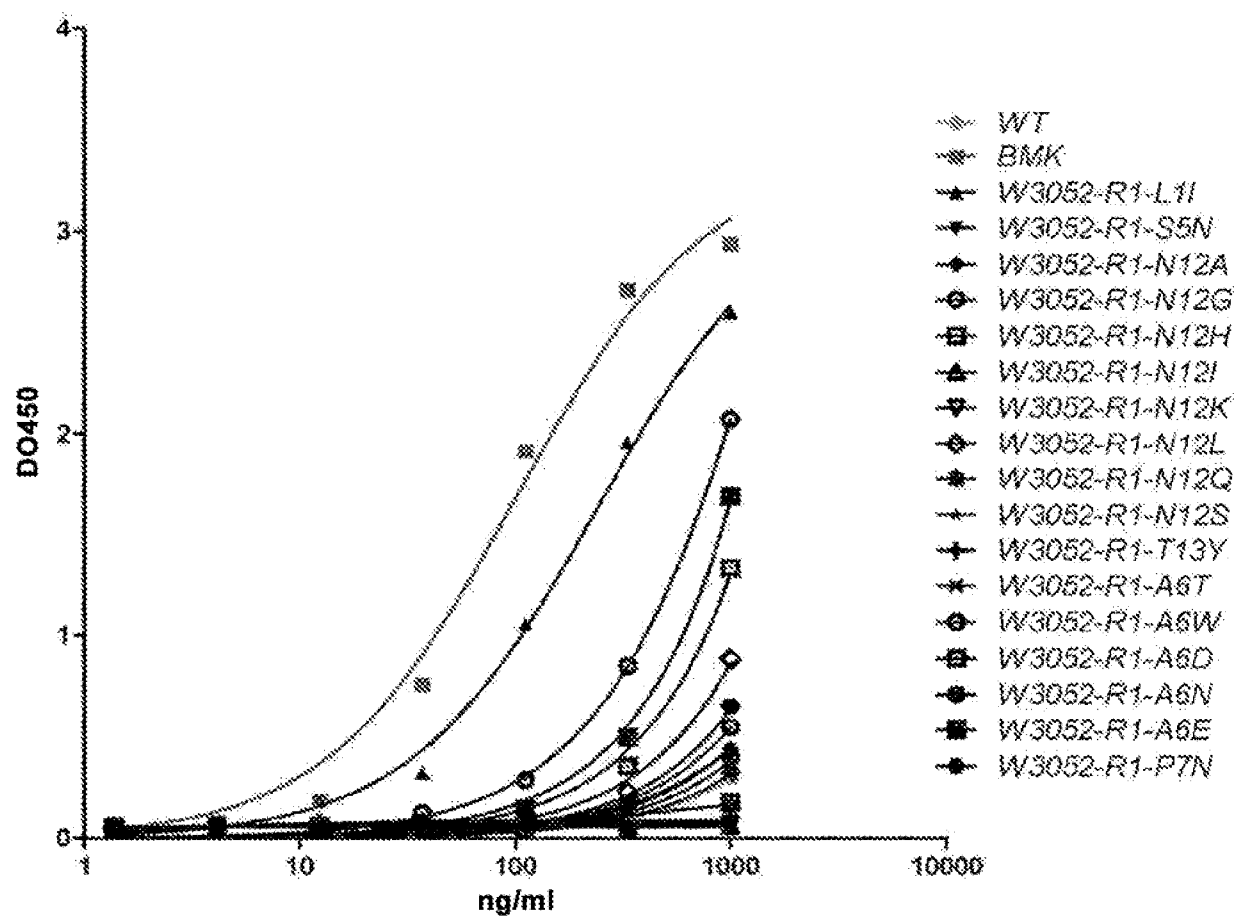
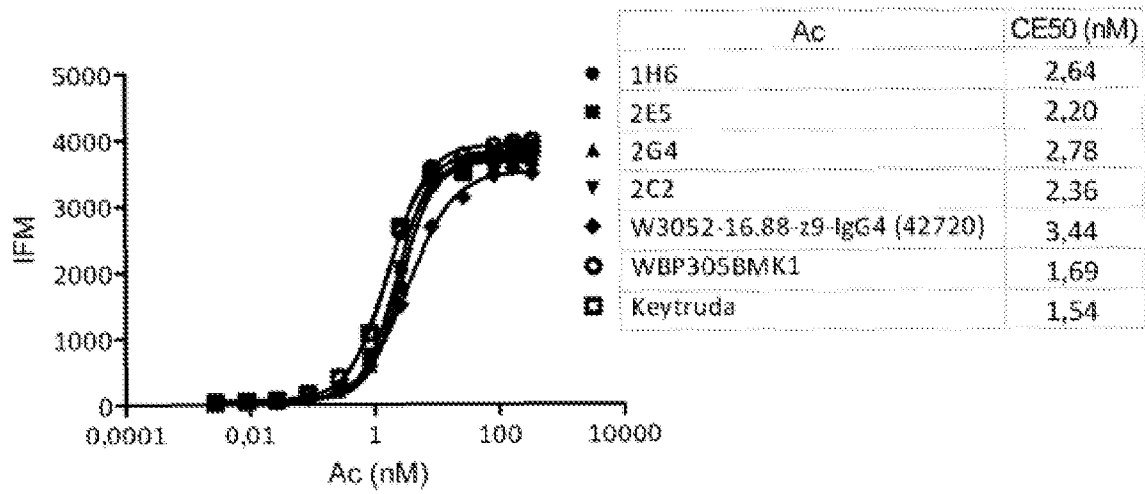
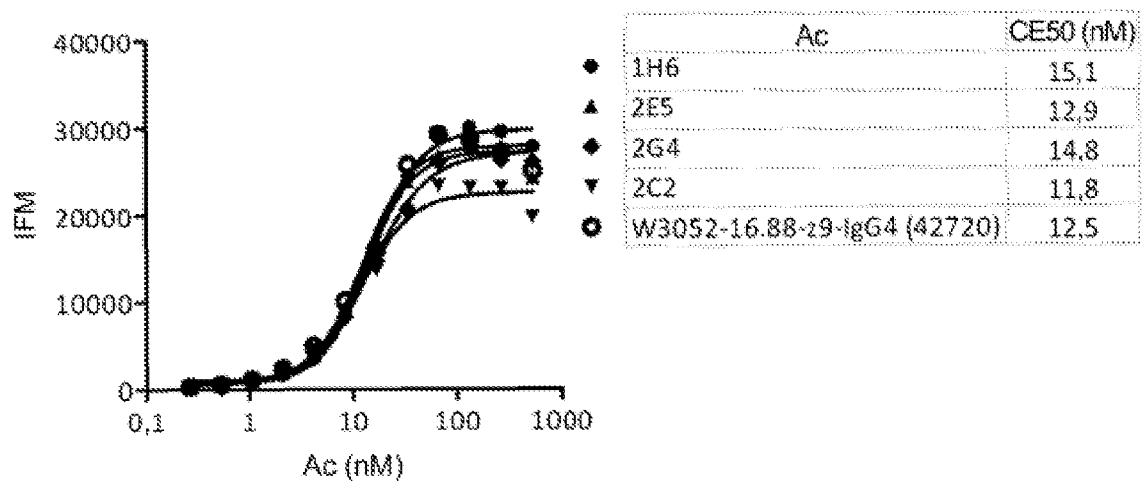


Figura 2

A



B



C

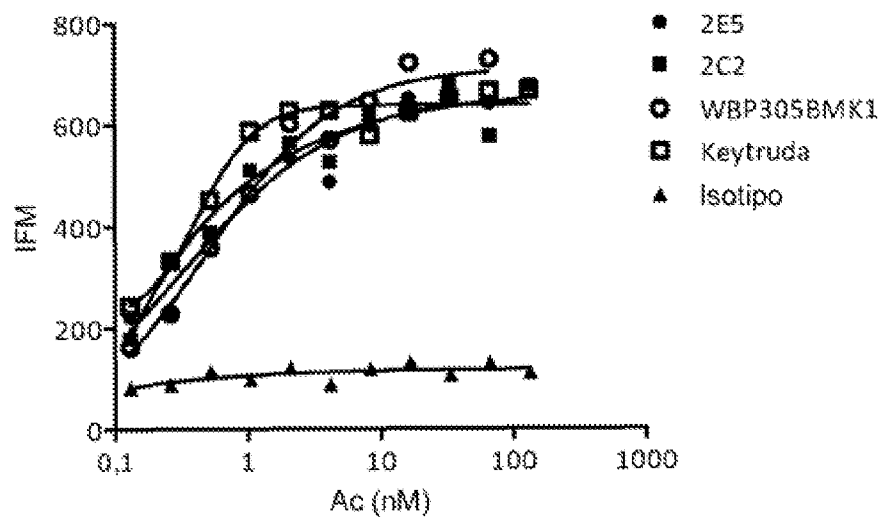
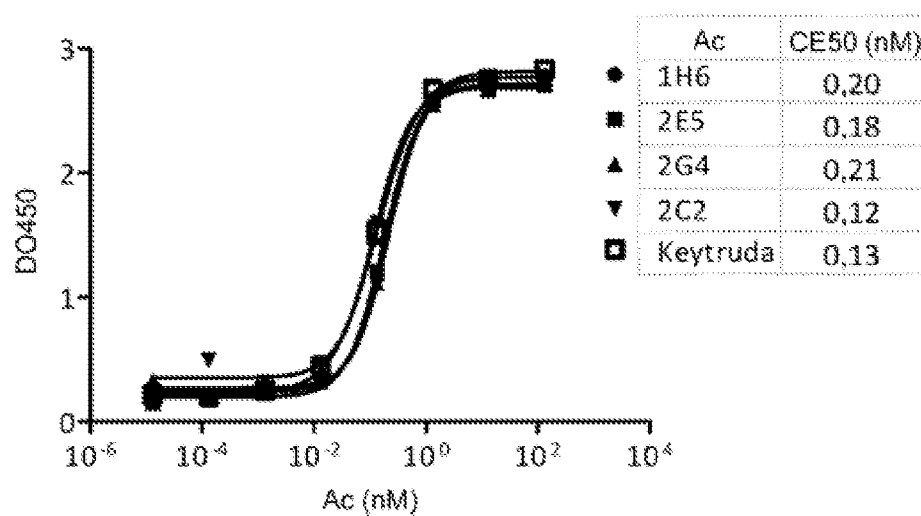
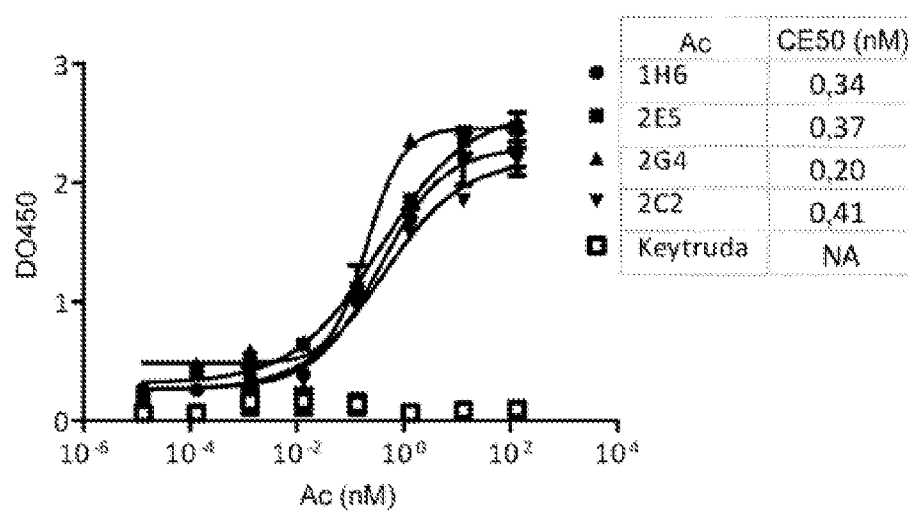


Figura 3



B



C

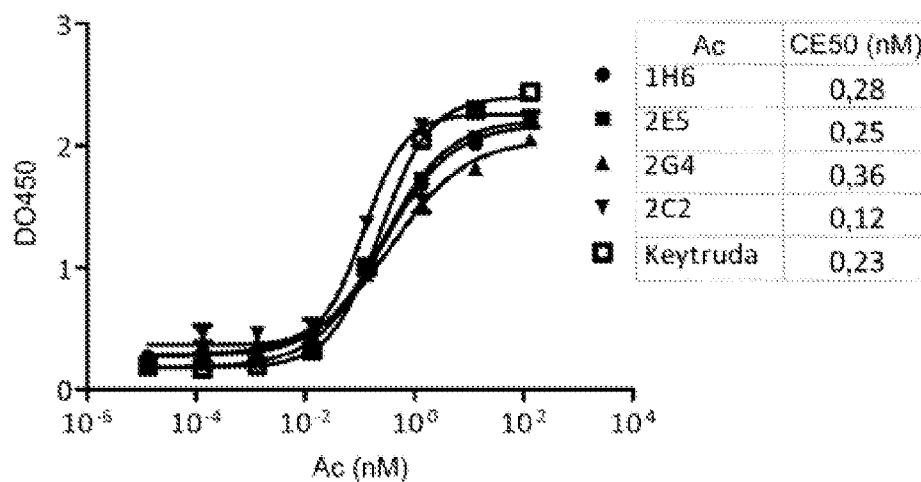


Figura 4

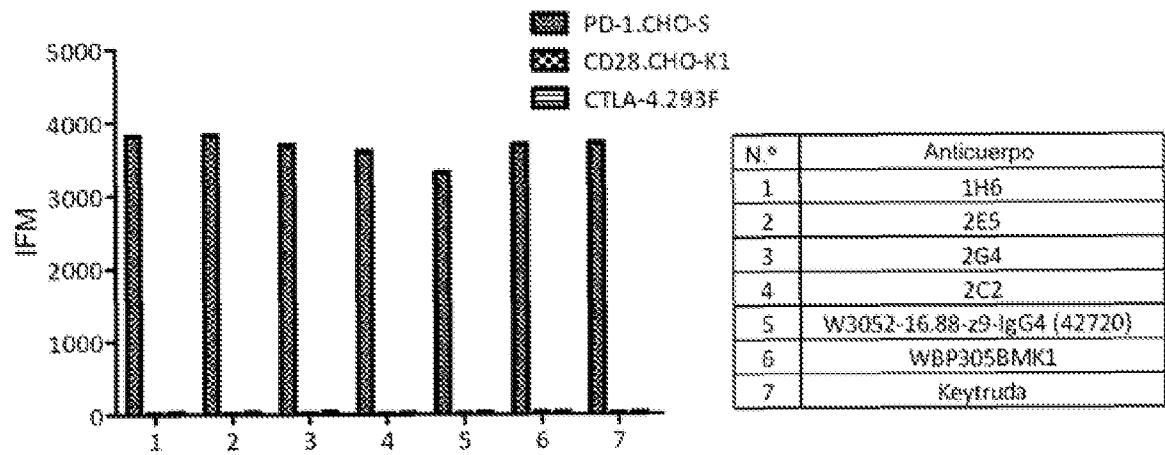
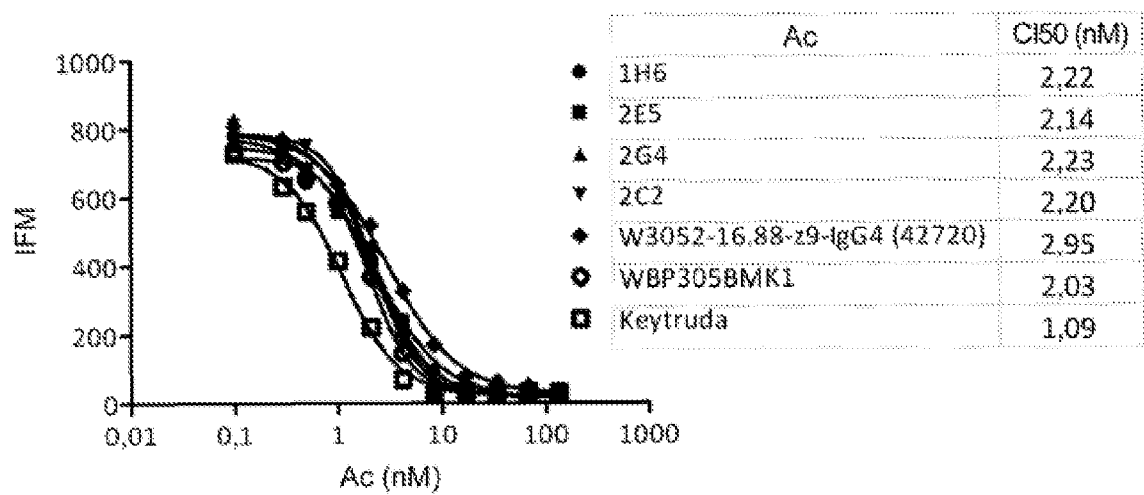


Figura 5

A



B

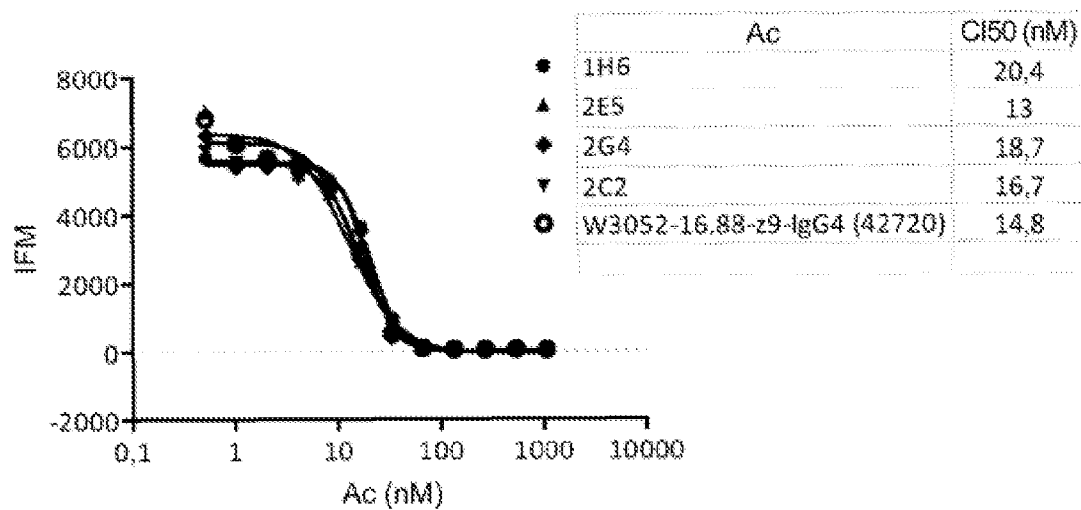


Figura 6

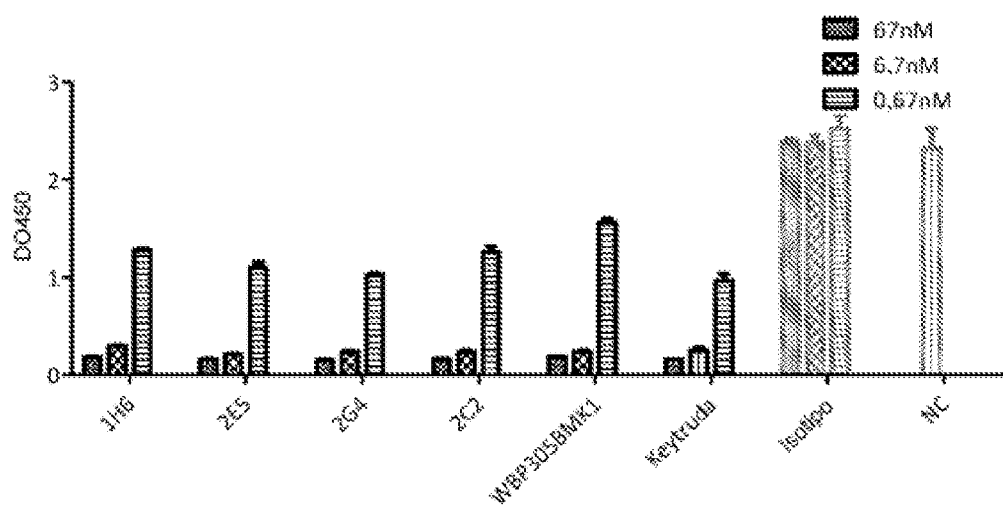
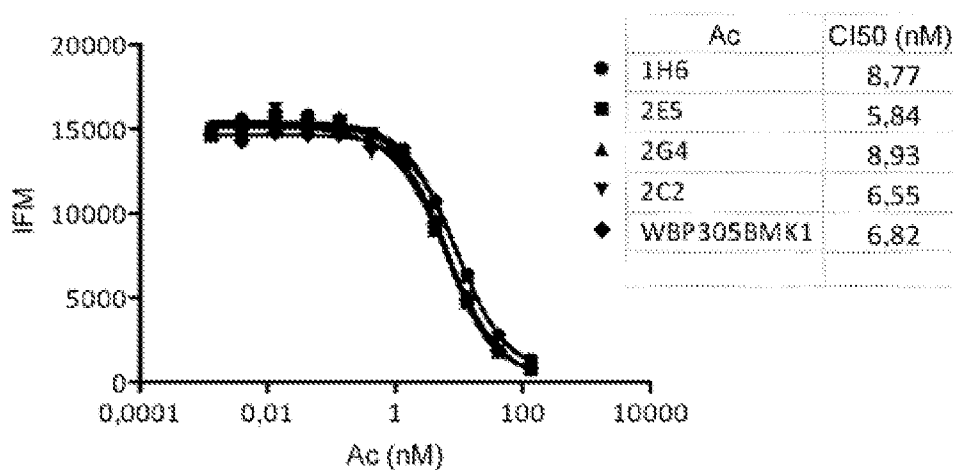


Figura 7

A



B

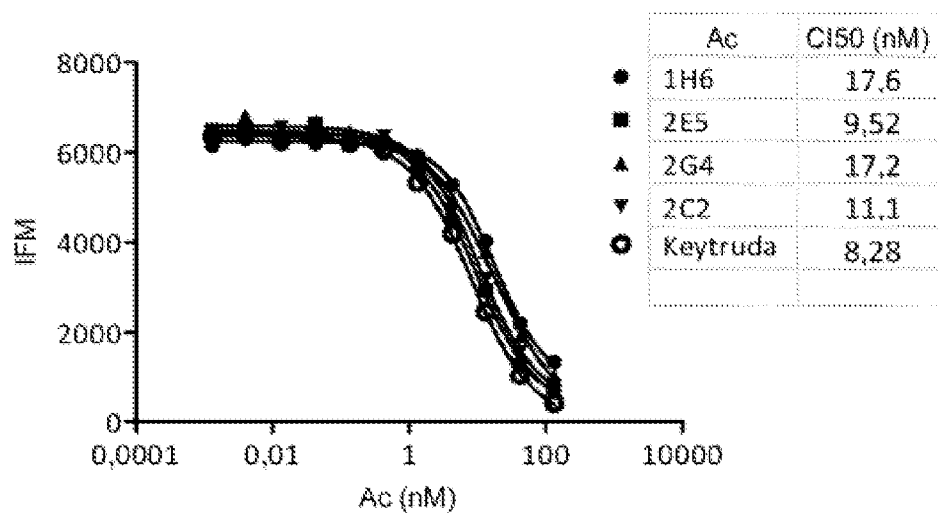


Figura 8B

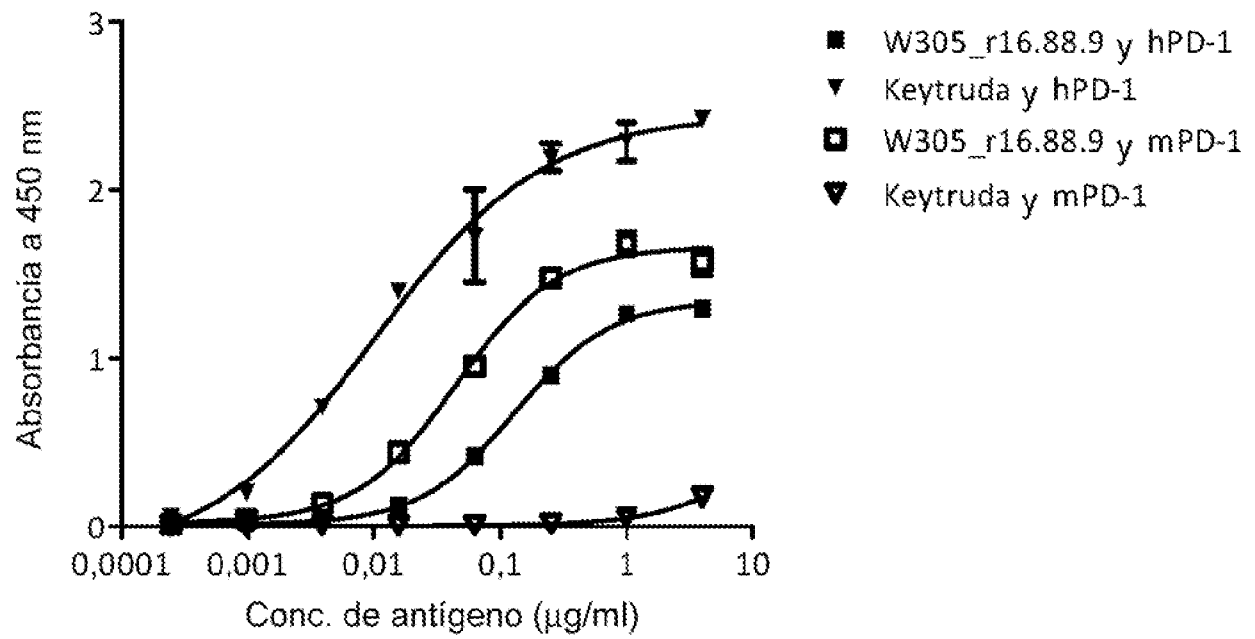


Figura 9

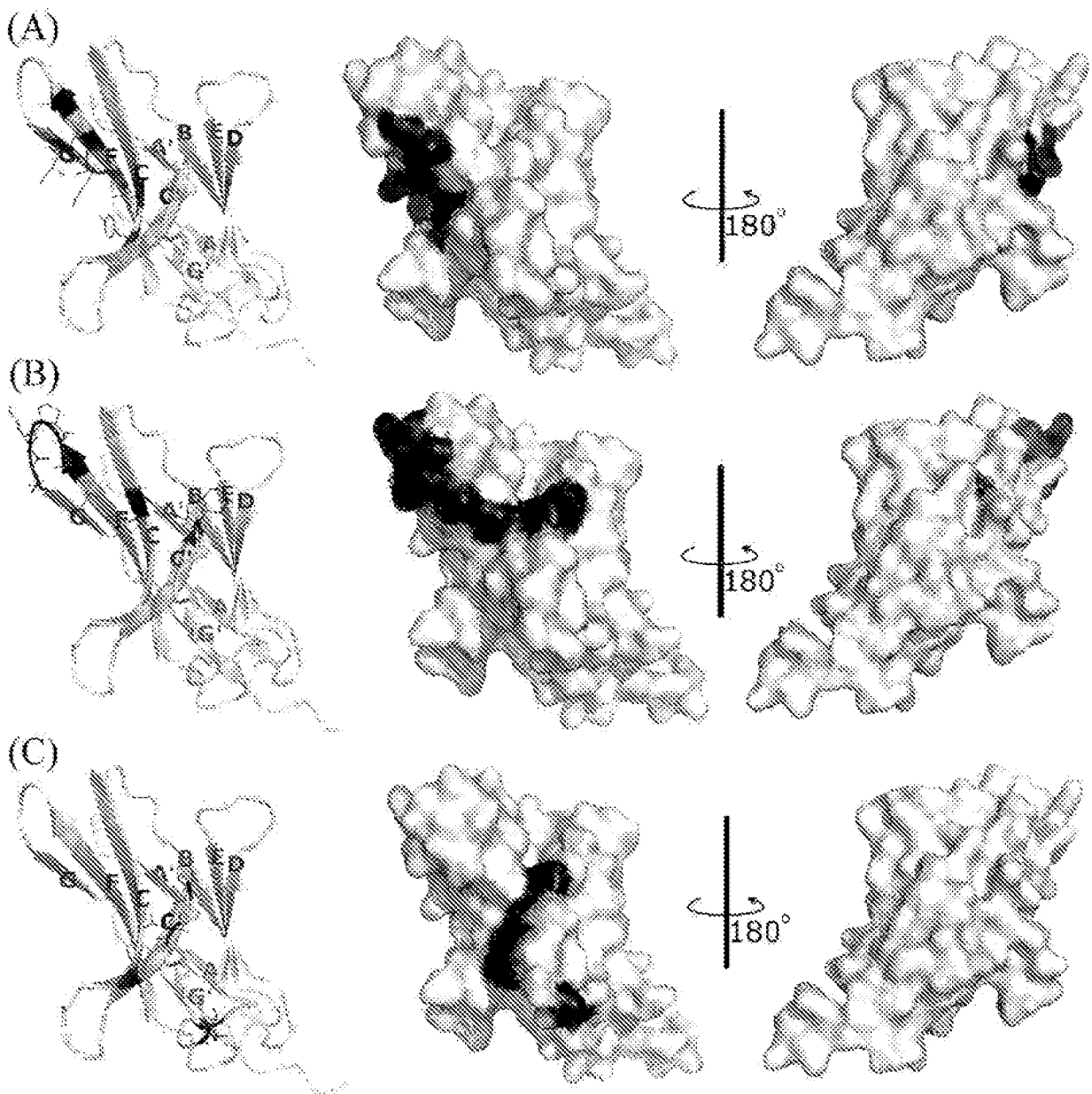


Figura 10

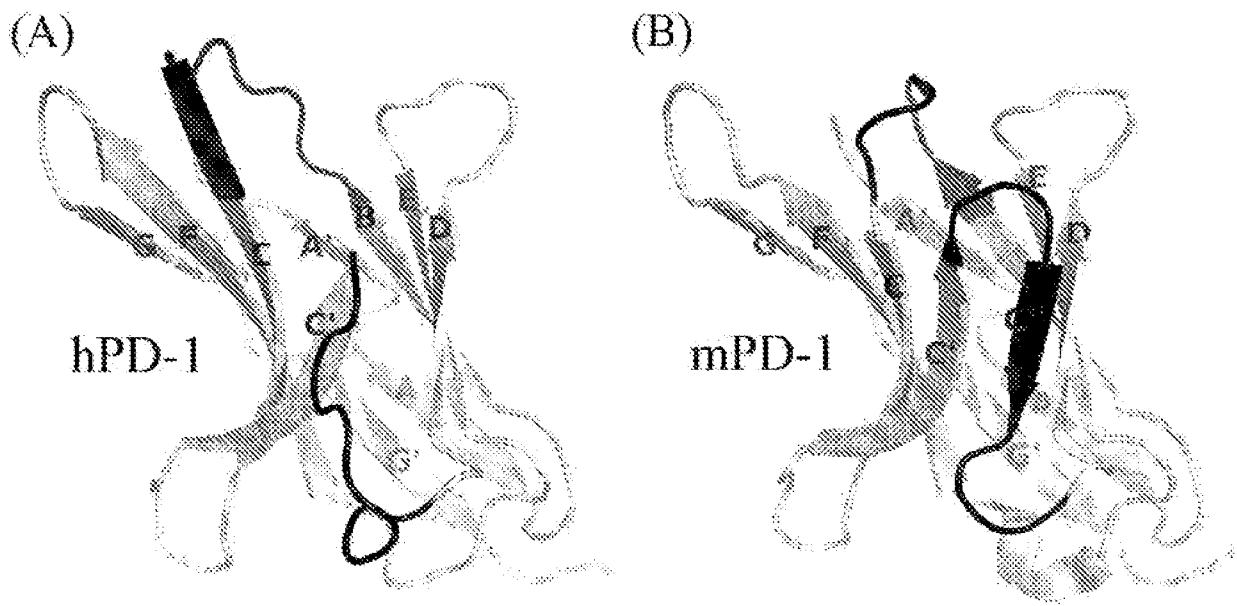
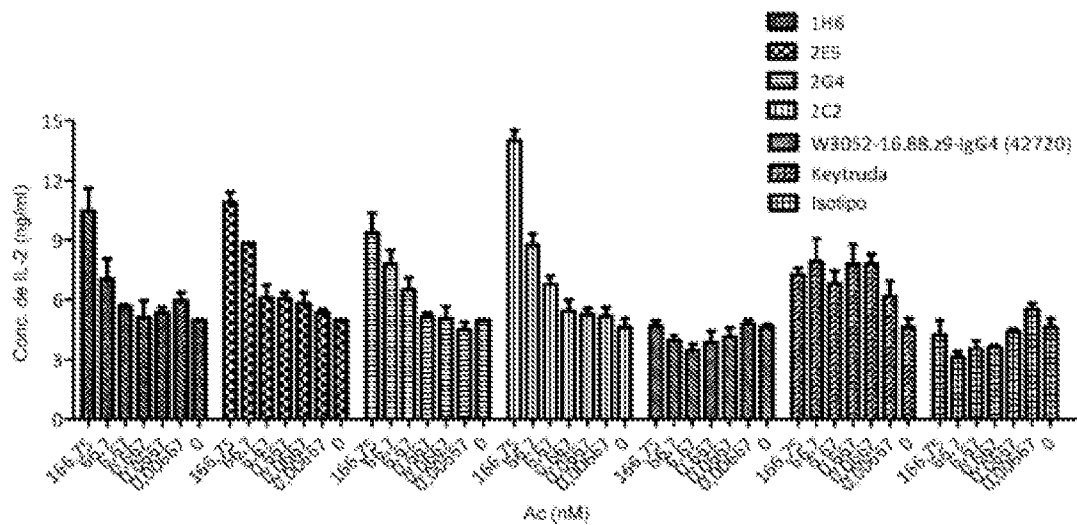


Figura 11



B

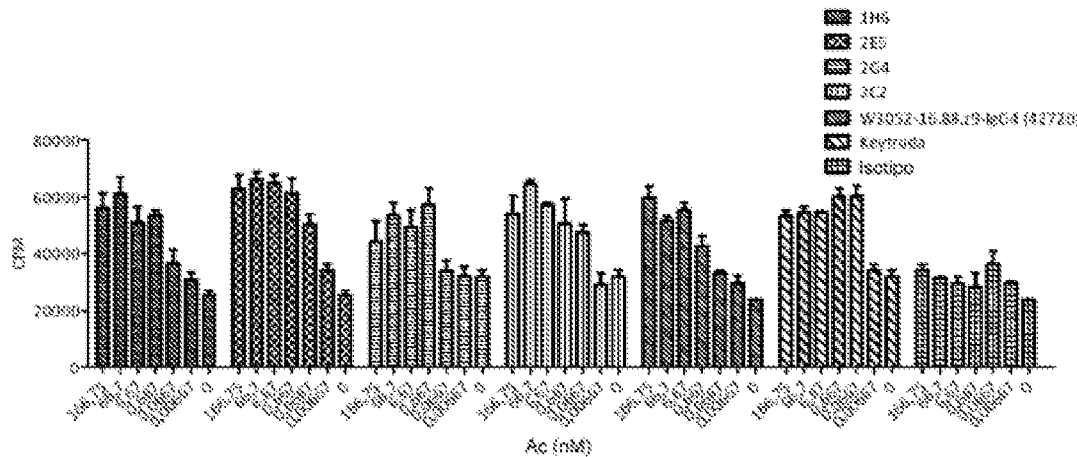
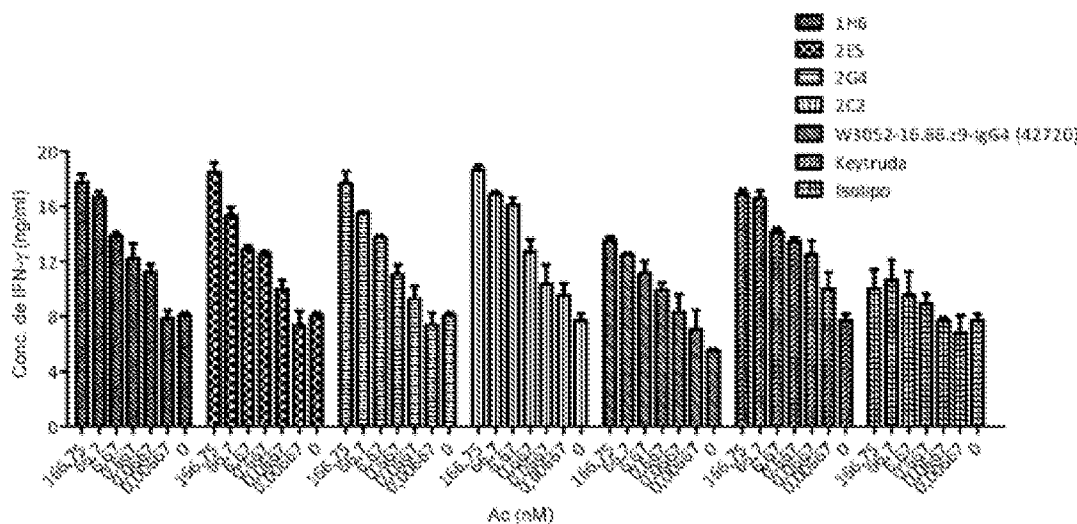


Figura 12

▲

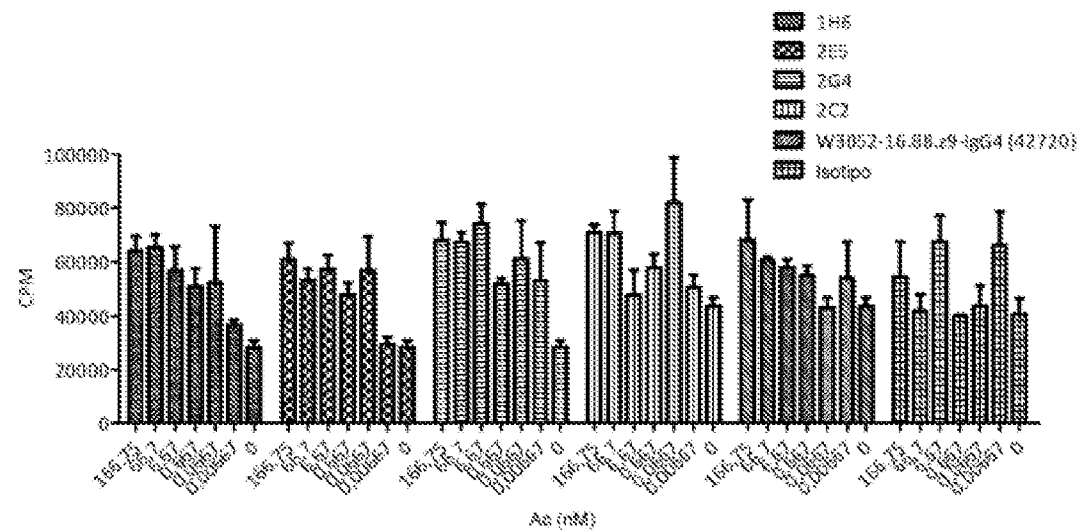
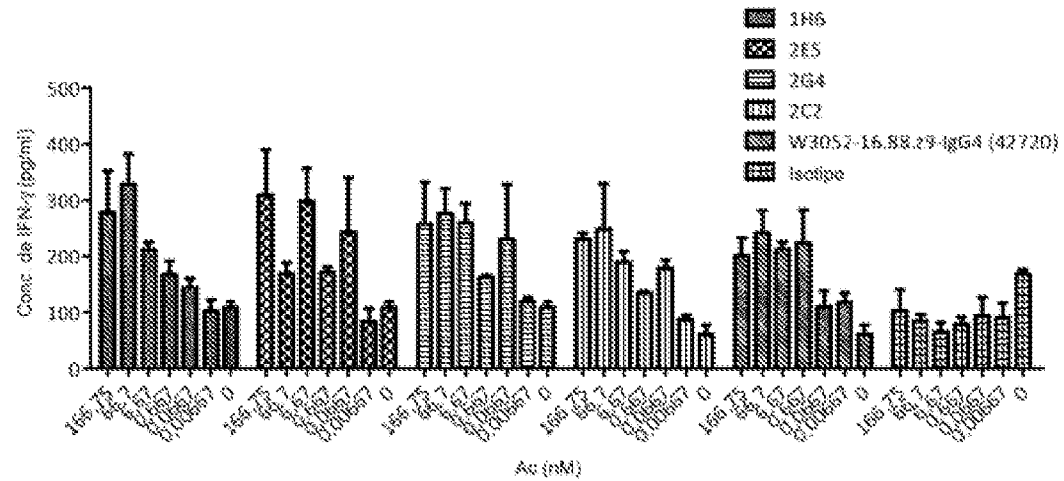
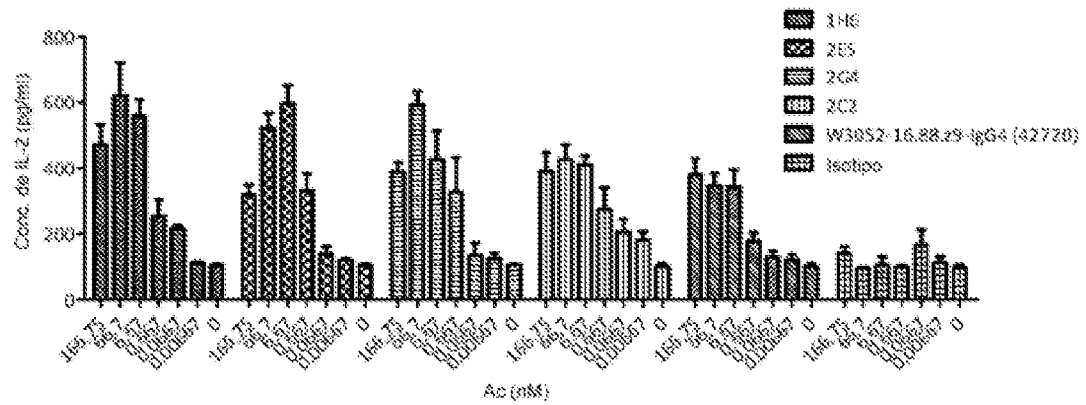
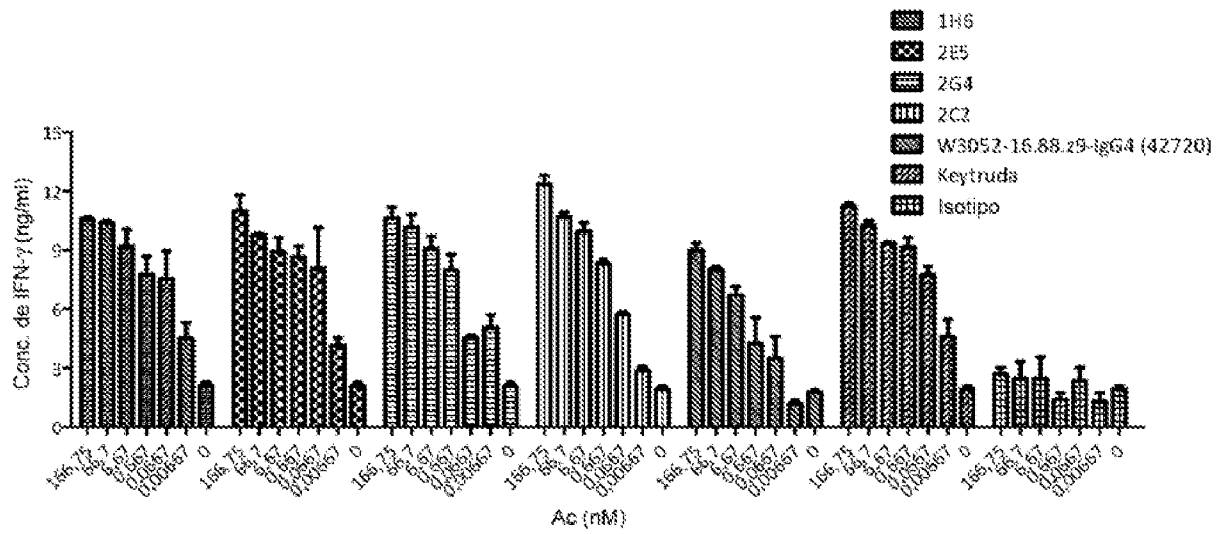


Figura 13

A



B

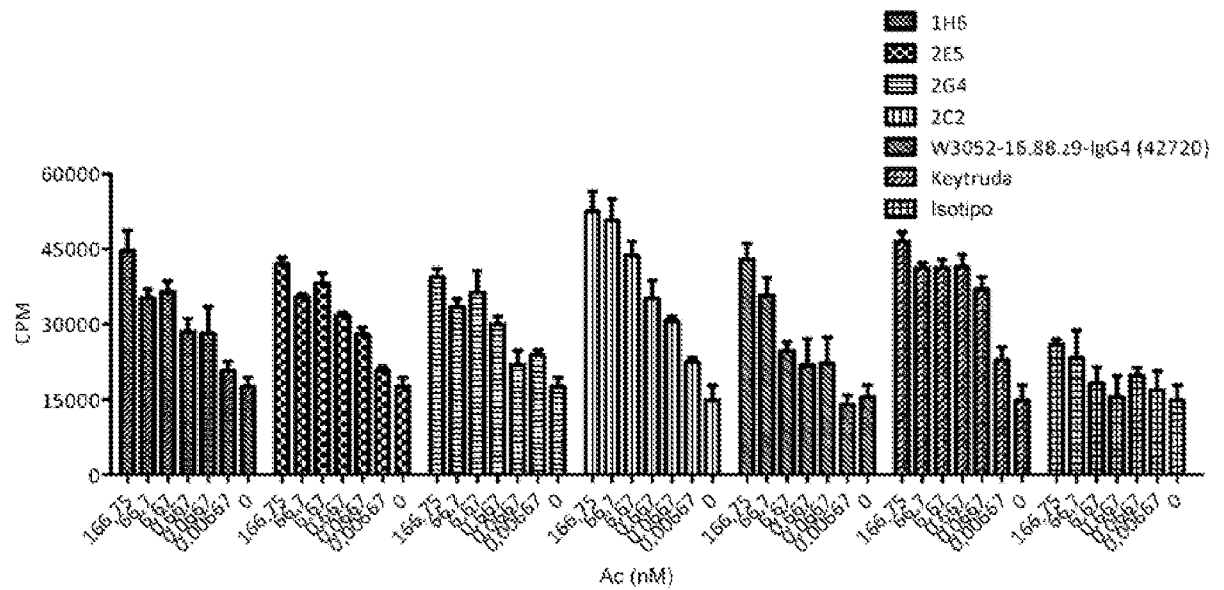
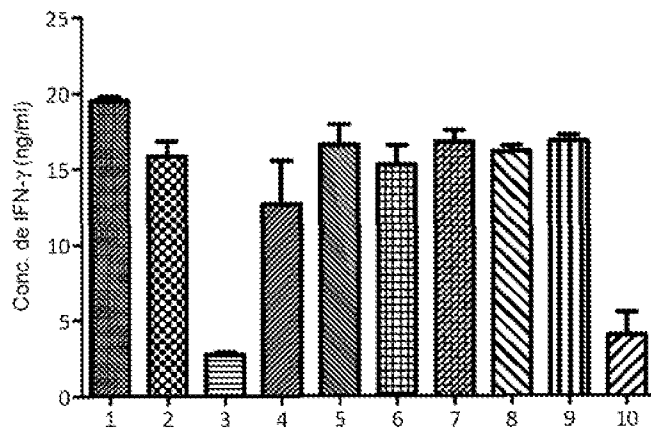


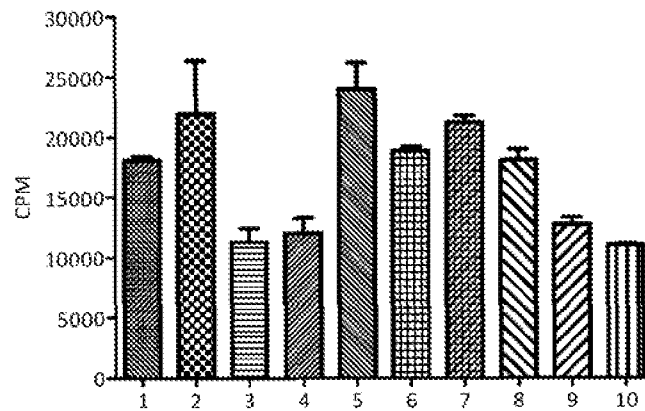
Figura 14

A



N.º	Muestra
1	Teff(2E5)
2	Teff(1E5)
3	Teff(1E5)/Treg(1E5)
4	Teff(1E5)/Treg(1E5)/W3052-16.88-z9-IgG4(42720)
5	Teff(1E5)/Treg(1E5)/1H6
6	Teff(1E5)/Treg(1E5)/2C2
7	Teff(1E5)/Treg(1E5)/2E5
8	Teff(1E5)/Treg(1E5)/2G4
9	Teff(1E5)/Treg(1E5)/Keytruda
10	Teff(1E5)/Treg(1E5)/Isotipo

B



N.º	Muestra
1	Teff(2E5)
2	Teff(1E5)
3	Teff(1E5)/Treg(1E5)
4	Teff(1E5)/Treg(1E5)/W3052-16.88-z9-IgG4(42720)
5	Teff(1E5)/Treg(1E5)/1H6
6	Teff(1E5)/Treg(1E5)/2C2
7	Teff(1E5)/Treg(1E5)/2E5
8	Teff(1E5)/Treg(1E5)/2G4
9	Teff(1E5)/Treg(1E5)/Keytruda
10	Teff(1E5)/Treg(1E5)/Isotipo

Figura 15

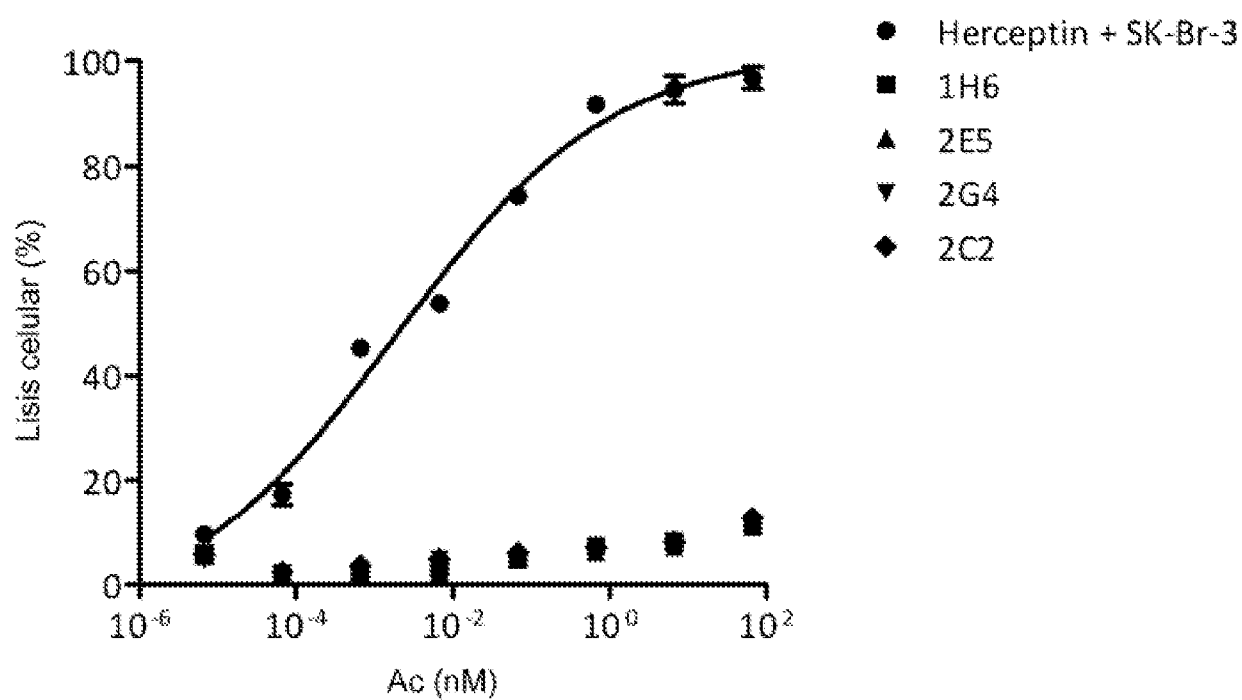


Figura 16

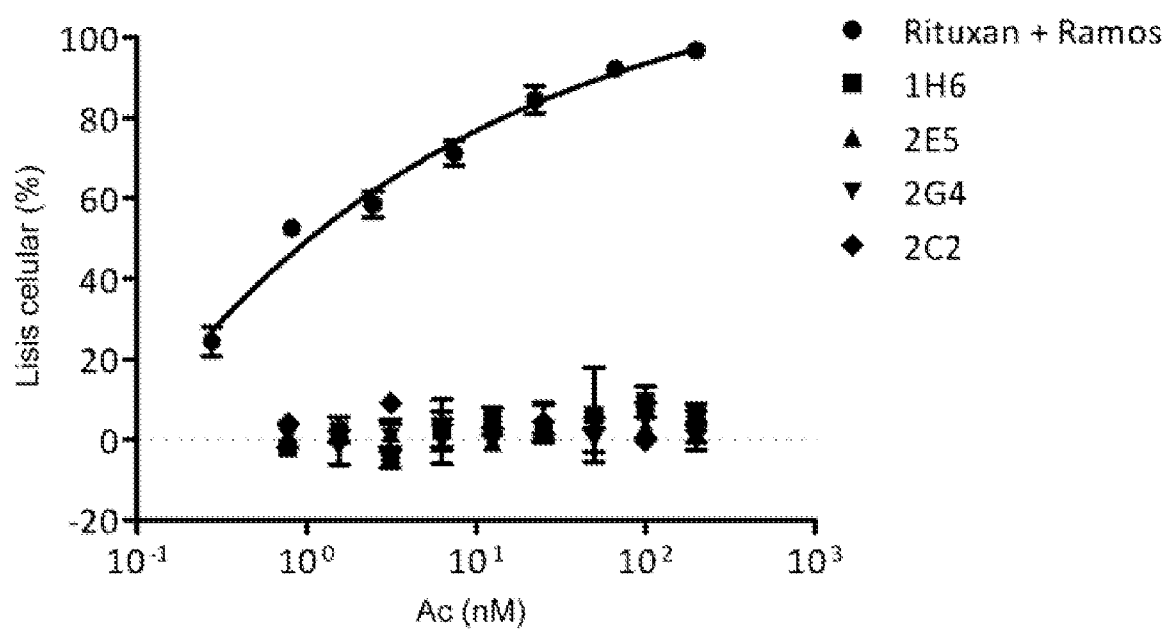


Figura 17

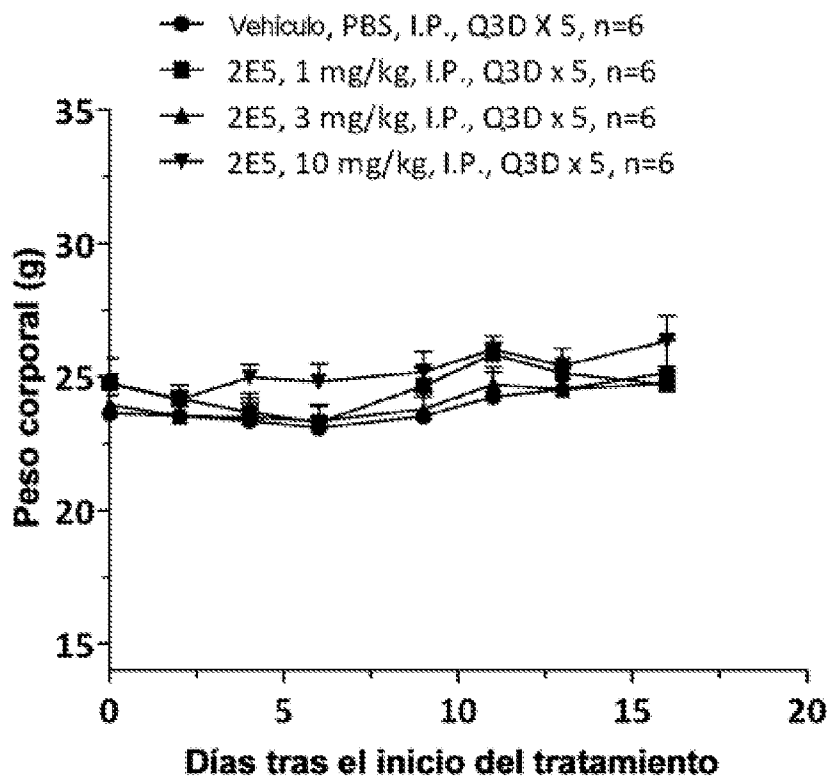


Figura 18

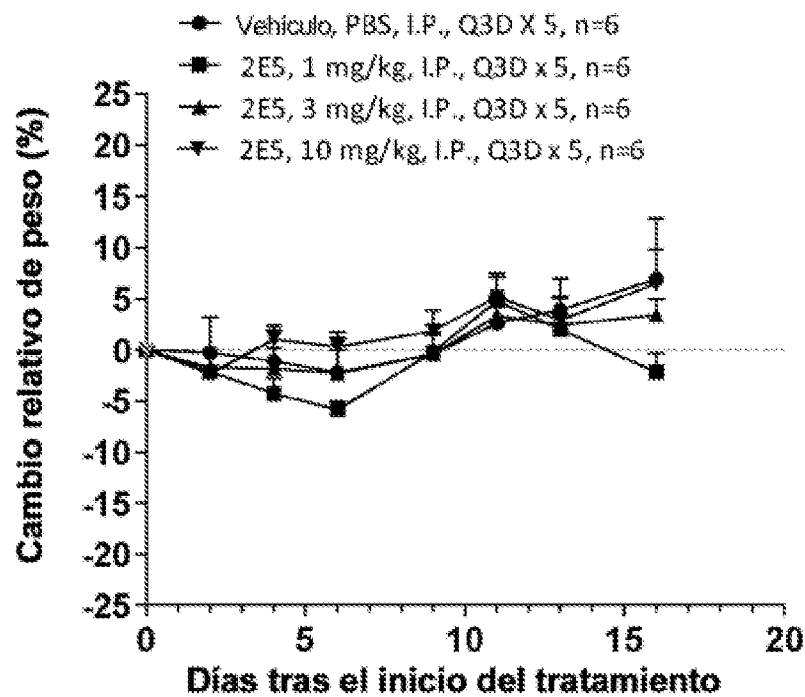


Figura 19

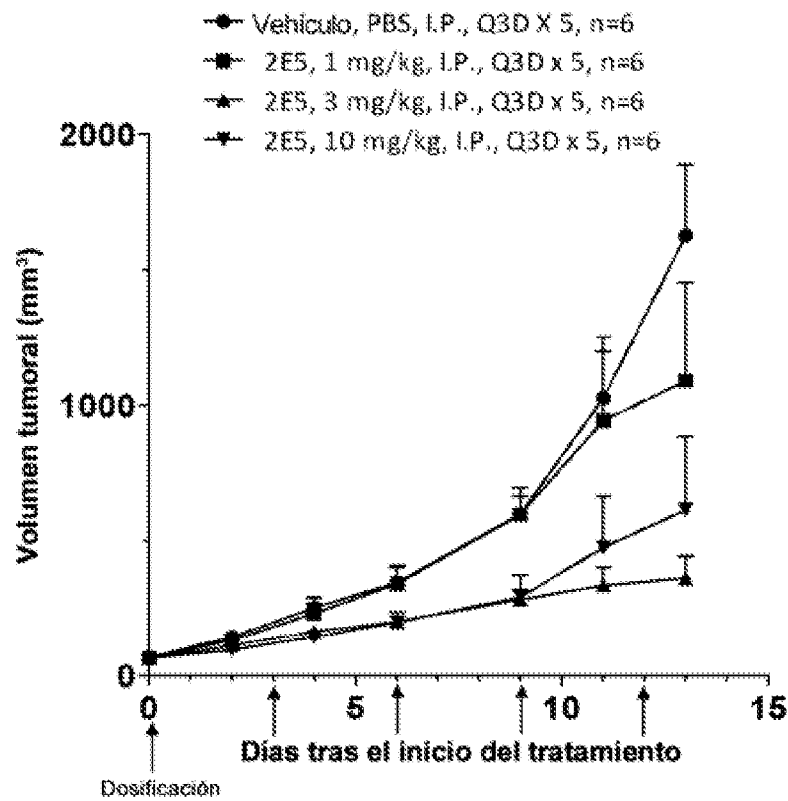


Figura 20

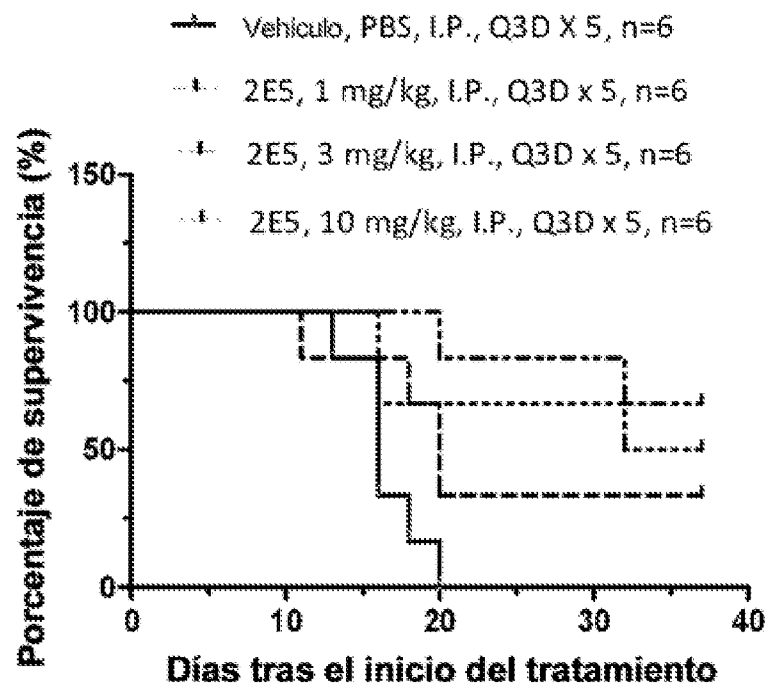


Figura 21