

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 001 154**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2017 PCT/CN2017/098465**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2018 WO18036472**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2017 E 17842895 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024 EP 3505535**

(54) Título: **Anticuerpo monoclonal anti-PD1, composición farmacéutica del mismo y uso del mismo**

(30) Prioridad:

23.08.2016 CN 201610705763

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

04.03.2025

(73) Titular/es:

**CTTQ-AKESO (SHANGHAI) BIOMED. TECH. CO., LTD. (100.00%)
Room A1001, Building 3, No. 2288, Shitai Road
Baoshan District
Shang 201908, CN**

(72) Inventor/es:

**LI, BAIYONG;
XIA, YU;
WANG, ZHONGMIN MAXWELL y
ZHANG, PENG**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 001 154 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

Anticuerpo monoclonal anti-PD1, composición farmacéutica del mismo y uso del mismo

5 Campo técnico

La presente invención pertenece al campo de la terapia tumoral y la inmunología molecular, y se refiere a un anticuerpo anti-PD1, a su composición farmacéutica y a sus métodos de uso. En concreto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-PD1.

10

Antecedentes técnicos

15

El receptor transmembrana PD1 (muerte celular programada 1, también conocido como PD-1) es un miembro de la familia de genes CD28, expresado en células T activadas, células B y células mieloides. Ambos ligandos de PD1 (es decir, PDL1 y PDL2) pertenecen a la superfamilia B7; en la que PDL1 se expresa ampliamente en una variedad de células, incluidas las células T, las células B, las células endoteliales y las células epiteliales, mientras que PDL2 sólo se expresa en células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas y los macrófagos.

20

Las células T desempeñan un papel muy importante en la eliminación de infecciones virales, y la respuesta antiviral de las células T suele estar asociada a la inmunopatogénesis. PD1 desempeña un papel vital en la regulación negativa de la activación de las células T. Aunque la regulación negativa mediada por PD1 sobre las células T puede reducir el daño tisular causado por la infección, bloquear o inhibir el efecto regulador negativo de PD1 puede conducir a enfermedades autoinmunes, por ejemplo la infección por el virus pancreático se puede eliminar de forma más eficaz en ratones carentes del gen PD1, pero puede conducir a un daño hepático más grave (Isai et al., 2003, J.Exp.Med.198:39-50). Además, los tumores con PD1 altamente expresado a menudo se convierten en cánceres que son difíciles de detectar (Hamanishi et al., 2007, Proc.Natl.Acad. Sci.USA 104:3360-5). Un método establecido para regular la expresión de PD1 es mediante la inyección de anticuerpos en el cuerpo.

25

Debido a las amplias perspectivas antitumorales y la asombrosa eficacia del anticuerpo anti-PD1, generalmente se cree que los anticuerpos contra la ruta de PD1 conducirán a avances en el tratamiento de una variedad de tumores: cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, melanoma (Homet MB, Parisi G., et al., Anti-PD1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015 Jun;42(3):466-473), leucemia y anemia (Held SA, Heine A, et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013 Sep;13(7):768-74).

30

35 Desde la publicación de datos de eficacia clínica sin precedentes en las reuniones anuales de la Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer (AACR) y la Sociedad Estadounidense de Oncología Clínica (ASCO) en 2012 y 2013, los anticuerpos anti-PD1 se han convertido en los nuevos medicamentos más populares en I+D en la industria farmacéutica mundial. Brahmer JR et al., (2015) FUTURE ONCOLOGY, 11(9): 1307-1326, describen el desarrollo clínico de nivolumab para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. McDermott J. et al., (2015) DRUGS OF TODAY, 51(1):7, describen el desarrollo clínico de pembrolizumab para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. El ensayo clínico NCT02383212 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02383212>) describe un estudio clínico de cemiplimab en pacientes con ciertos tipos de cáncer.

40

45 En la actualidad, todavía existe la necesidad de desarrollar nuevos anticuerpos anti-PD1 con mejor eficiencia de unión para bloquear eficazmente la unión de PD1 a PDL1.

Sumario de la invención

50

A través de una investigación exhaustiva y un trabajo creativo, al inmunizar ratones con el sistema de expresión de PD1 recombinante expresado en células de mamíferos como antígeno, los inventores obtuvieron células de hibridoma mediante la fusión de esplenocitos de ratón y células de mieloma. Al examinar una gran cantidad de muestras, los inventores obtuvieron la línea celular de hibridoma LT003 (n.º de depósito de acceso CCTCC: C2015105).

55

Los inventores descubrieron sorprendentemente que la línea de células de hibridoma LT003 es capaz de segregar un anticuerpo monoclonal específico (denominado 14C12) que se une específicamente a PD1, y este anticuerpo monoclonal puede bloquear eficazmente la asociación de PD1 a PDL1.

60

Además, los inventores generaron de forma creativa un anticuerpo anti-PD1 humanizado (denominado 14C12H1L1).

Más sorprendentemente, los inventores descubrieron que los anticuerpos 14C12 y 14C12H1L1 de la presente invención pueden unirse eficazmente a células T humanas, activar las células T e inducir la secreción de IFN-γ e IL-2 de linfocitos humanos. Los anticuerpos 14C12 y 14C12H1L1 de la presente invención tienen el potencial de convertirse

en medicamentos para prevenir y tratar enfermedades malignas, que incluyen cáncer de pulmón, melanoma, cáncer renal, cáncer de ovario y leucemia, así como anemia.

La invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

5

A continuación se describe lo siguiente:

Un anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno, en el que,

10 la región variable de cadena pesada (V_H) de dicho anticuerpo monoclonal comprende: las CDR con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:9-11;

y/o

15 la región variable de cadena ligera (V_L) de dicho anticuerpo monoclonal comprende: las CDR con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:12-14.

Un anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno, en el que,

20 la secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo monoclonal se elige entre SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 6;

y/o

la secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo monoclonal se elige entre SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 8.

25 Según la presente invención, el anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno, comprende:

(1) V_H mostrada en SEQ ID NO: 2 y V_L mostrada en SEQ ID NO: 4;

30 (2) V_H mostrada en SEQ ID NO: 6 y V_L mostrada en SEQ ID NO: 8.

Las regiones variables en las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo regulan la actividad de unión. Cada cadena contiene tres regiones hipervariables, a saber, la región determinante de la complementariedad (CDR) (HCDR1, HCDR2 y HCDR3 en la cadena pesada (H), y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 en la cadena ligera (L)), que están definidas por Kabat, et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición (1991), volumen 1-3, publicación NIH 91-3242, Bethesda MD).

35 A través de técnicas bien conocidas por el personal técnico en el campo descrito aquí, por ejemplo analizando las secuencias de aminoácidos en la CDR de las secuencias de anticuerpos monoclonales en los apartados (1) y (2) anteriores a través de la base de datos VBASE2:

40 Los anticuerpos 14C12 y 14C12H1L1 aquí comprenden la misma CDR:

45 en los que las secuencias de aminoácidos de las 3 regiones CDR de V_H son las siguientes:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 9),

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 10),

50 HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 11);

en los que las secuencias de aminoácidos de las 3 regiones CDR de V_L son las siguientes:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 12),

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 13),

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 14).

60 En cierto ejemplo, el dicho anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que el dicho anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno se seleccionan de Fab, Fab', F(ab')2, Fd, Fv, dAb, CDR, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), anticuerpos humanizados, anticuerpos químicos o anticuerpos biespecíficos.

En ciertos aspectos, el dicho anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno, en el que dicho anticuerpo monoclonal se une a la proteína PD1 con K_D menor que aproximadamente 10^{-5} M, por ejemplo, menor que aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, o menos; preferiblemente, detectado por el equipo de interacción molecular Fortebio.

5 En ciertos aspectos, el dicho anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno, en el que el dicho anticuerpo monoclonal se une a la proteína PD1 con una EC_{50} menor que aproximadamente 100 nM, por ejemplo, menor que 10 nM, 1 nM, 0,9 nM, 0,8 nM, 0,7 nM, 0,6 nM, 0,5 nM, 0,4 nM, 0,3 nM, 0,2 nM, 0,1 nM o menos. Específicamente, la dicha EC_{50} se determina mediante un ELISA indirecto.

10 En ciertos aspectos, el dicho anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo monoclonal se une a la proteína PD1 con K_D menor que aproximadamente 10^{-5} M, tal como menor que aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, o menos,

15 En ciertas realizaciones, el dicho anticuerpo monoclonal o su fragmento de unión a antígeno, en el que dicho anticuerpo monoclonal contiene regiones no CDR de especies distintas del ratón, por ejemplo del ser humano.

20 En ciertas realizaciones, el dicho anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno, en el que dicho anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular de hibridoma LT003, y dicha línea celular de hibridoma LT003 se conserva en el Centro de Colección de Cultivos Tipo de China (CCTCC) con el n.º de acceso de depósito CCTCC: C2015105.

25 La descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica capaz de codificar V_H del anticuerpo, en la que,

la V_H de dicho anticuerpo comprende: CDR con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9-11;

Específicamente, la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6;

30 Más específicamente, la dicha molécula de ácido nucleico tiene las secuencias nucleotídicas de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5.

35 La descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica capaz de codificar V_L del anticuerpo, en la que,

la V_L del anticuerpo comprende CDR con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12-14;

40 Específicamente, la V_L de dicho anticuerpo tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 8;

Más específicamente, la dicha molécula de ácido nucleico tiene las secuencias nucleotídicas de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7.

45 La presente invención se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada descrita aquí.

La presente invención se refiere a una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico aislada descrita aquí, o el vector descrito en la presente invención.

50 La presente invención se refiere a un método para preparar el anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente invención, cultivando la célula hospedadora en la presente invención en condiciones apropiadas y recuperando dicho anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno del mismo del cultivo celular.

55 La presente invención se refiere a la línea celular de hibridoma LT003 que se conserva en el Centro de Colección de Cultivos Típicos de China (CCTCC) con el n.º de acceso de depósito CCTCC: C2015105.

60 La presente invención se refiere a un conjugado que consiste en un anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno y una parte conjugante, en el que, el dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno descritos en la presente invención, y la dicha parte conjugante es un marcador detectable. Específicamente, la dicha parte conjugante son isótopos radiactivos, fluoresceína, materiales luminiscentes, sustancias colorantes o enzimas.

65 La presente invención se refiere a kits de reactivos, que consisten en el anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno, o sus conjugados descritos en la invención;

- 5 Específicamente, los kits de reactivos pueden contener un anticuerpo secundario, que reconoce específicamente el dicho anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno; opcionalmente, el dicho anticuerpo secundario puede contener marcadores detectables, tales como isótopos radiactivos, fluoresceína, materiales luminiscentes, sustancias colorantes o enzimas.
- 10 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el dicho anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno, o sus conjugados descritos en la invención. Opcionalmente, puede comprender además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 La presente invención se refiere al dicho anticuerpo monoclonal o a sus fragmentos de unión a antígeno o a sus conjugados descritos en la invención para uso en la prevención y/o tratamiento y/o tratamiento adyuvante y/o diagnóstico de tumores o anemia; específicamente, los dichos tumores pueden ser melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario y leucemia.
- 20 Los presentes inventores han descubierto a través de experimentos con animales que 14C12H1L1 puede inhibir eficazmente el crecimiento de células tumorales MC38 inoculadas en el lado derecho por vía subcutánea en ratones PD-1 HuGEMM, y que el fármaco de anticuerpo 14C12H1L1 puede inhibir significativamente el crecimiento del tumor en ratones portadores de tumores PD-1 HuGEMM, teniendo una eficacia equivalente al fármaco de anticuerpo monoclonal comercializado Nivolumab, que es un fármaco aprobado que se dirige la misma diana.
- 25 La presente invención se refiere al uso del anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno o sus conjugados descritos en la presente invención para la preparación de fármacos con los siguientes fines:
- 30 Bloquear la unión de PD1 al ligando PD1,
- 35 Regular (por ejemplo, disminuir) la actividad o el nivel de PD1,
- 40 Aliviar la inmunosupresión de PD1, o
- 45 Aumentar la expresión de IFN- γ y/o IL-2 en los linfocitos T;
- 50 Específicamente, el dicho ligando PD1 es PDL1 o PDL2, preferiblemente PDL1.
- 55 La descripción se refiere a un método *in vitro* para aplicar a células que lo necesitan una dosis eficaz del anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno o sus conjugados descritos en la presente invención; o una dosis eficaz del anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno o sus conjugados descritos en la presente invención para uso en una método *in vivo* para aplicar a sujetos que lo necesitan, y el dicho método se selecciona de los siguientes:
- 60 Métodos para bloquear la unión de PD1 al ligando PD1,
- 65 Métodos para regular (por ejemplo, disminuir) la actividad o el nivel de PD1,
- 70 Métodos para aliviar la inmunosupresión de PD1, o
- 75 Métodos para aumentar la expresión de IFN- γ y/o IL-2 en linfocitos T;
- 80 Específicamente, el dicho ligando PD1 es PDL1 o PDL2, preferiblemente PDL1.
- 85 En un aspecto, dicho método *in vitro* está destinado a fines no terapéuticos ni de diagnóstico.
- 90 El interferón γ (IFN γ) es producido principalmente de forma natural por las células asesinas naturales (NK) y las células T asesinas naturales (NKT), o es producido por las células T efectoras que consisten en células Th1 CD4 y linfocitos T citotóxicos CD8 después de ser estimulados por antígenos específicos. Como una citocina importante de la inmunidad innata y adquirida, el IFN γ desempeña un papel importante en la antagonización o inhibición de infecciones virales, algunas bacterianas y protozoarias. Mientras tanto, el IFN γ puede activar los macrófagos e inducir la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo 2 para activar respuestas inmunes para controlar la progresión de los tumores (Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. Advances in Immunology 2007; 96:41-101). En el estudio *in vitro* de la presente invención, el anticuerpo anti-PD1 puede inducir la secreción de IFN γ para activar respuestas inmunes.

La interleucina 2 (IL-2) producida por las células T es un factor de crecimiento que regula los subconjuntos de células T y un factor crucial que regula las respuestas inmunitarias, promueve la proliferación de células B activadas, y participa en las respuestas de anticuerpos, la hematopoyesis y la vigilancia oncológica. La IL-2 humana recombinante ha sido aprobada por la FDA de EE. UU. para el tratamiento de tumores malignos (incluido el melanoma, el tumor renal, etc.) mientras se realizan estudios clínicos para el tratamiento de infecciones virales crónicas (Chavez, AR, et al., Pharmacologic administration of interleukin-2. Ann N Y Acad Sci, 2009;1182:p.14-27). En estudios *in vitro*, el anticuerpo anti-PD1 de la presente invención puede aliviar específicamente la inmunosupresión de PD1, activar células T e inducir la producción de IL-2, mostrando perspectivas prometedoras de amplias aplicaciones en terapias genéticas para enfermedades neoplásicas y parasitarias.

El anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno o sus conjugados descritos en la presente invención es para uso en la prevención y/o tratamiento y/o tratamiento adyuvante y/o diagnóstico de tumores o anemia; específicamente, los dichos tumores pueden ser melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario o leucemia.

El anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión al antígeno o sus conjugados descritos en la presente invención se utilizan en un método para:

- Bloquear la unión de PD1 al ligando PD1,
- Regular (por ejemplo, disminuir) la actividad o el nivel de PD1,
- Aliviar la inmunosupresión de PD1, o
- Aumentar la expresión de IFN- γ y/o IL-2 en los linfocitos T;

Especificamente, el dicho ligando PD1 es PDL1 o PDL2, preferiblemente PDL1.

En un ejemplo específico, el anticuerpo monoclonal o sus fragmentos de unión a antígeno o los conjugados de los mismos descritos en la presente invención sólo bloquean la unión de PD1 a PDL1.

A menos que se defina lo contrario aquí, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. Además, las técnicas de laboratorio de cultivo celular y de tejidos, genética molecular, química de oligonucleótidos o polinucleótidos, e inmunología descritas aquí son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Mientras tanto, para comprender mejor la presente invención, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, se entenderán con los siguientes significados:

Como se utiliza en la presente invención, la expresión "Secuencia de aminoácidos de la proteína PD1 (Proteína de muerte celular programada 1, NCBI GenBank: NP_005009.2)" comprende la proteína PD1 de longitud completa, o PD1ECD (segmento extracelular de PD1) o fragmentos que contienen PD1ECD; y también comprende la proteína de fusión de PD1ECD, por ejemplo fusionada con los fragmentos de proteína Fc de IgG de ratón o humano (mFc o hFc). Además, como entenderán los expertos en la técnica, la secuencia de aminoácidos de la proteína PD1 puede tener mutaciones naturales o artificiales (incluidas, pero sin limitarse a, sustituciones, delecciones y/o adiciones), que no afecten a sus funciones biológicas. Por lo tanto, en la presente invención, la expresión "proteína PD1" debe incluir todas esas secuencias y sus variantes naturales o artificiales. Además, al describir los fragmentos de secuencia de la proteína PD1, los dichos fragmentos de secuencia comprenden tanto los fragmentos de secuencia como los fragmentos de secuencia correspondientes en sus variantes naturales o artificiales.

Como se utiliza en esta invención, la expresión "Secuencia de aminoácidos de la proteína PDL1 (Ligando de muerte programada 1, NCBI GenBank ID: NP_054862.1)" comprende la proteína PDL1 de longitud completa, o PDL1ECD (segmento extracelular de PDL1) o fragmentos que contienen PDL1ECD; y también comprende la proteína de fusión de PDL1ECD, por ejemplo fusionada con los fragmentos de proteína Fc de IgG de ratón o humana (mFc o hFc). Además, como comprenderán los expertos en la técnica, la secuencia de aminoácidos de la proteína PDL1 puede tener mutaciones naturales o artificiales (incluidas, pero sin limitarse a, sustituciones, delecciones y/o adiciones), que no afecten a sus funciones biológicas. Por lo tanto, en la presente invención, la expresión "proteína PDL1" debe incluir todas esas secuencias y sus variantes naturales o artificiales. Además, al describir los fragmentos de secuencia de la proteína PDL1, los dichos fragmentos de secuencia comprenden tanto los fragmentos de secuencia como los fragmentos de secuencia correspondientes en sus variantes naturales o artificiales.

Como se utiliza en esta invención, el término "EC₅₀" se refiere a la concentración para el 50% del efecto máximo.

Como se utiliza en esta invención, el término "anticuerpo" se refiere a proteínas de inmunoglobulina, que están compuestas típicamente de dos pares de cadenas polipeptídicas (cada par tiene una cadena "ligera" (L) y una cadena

"pesada" (H)). Las cadenas ligeras se clasifican como cadenas ligeras κ y λ. Las cadenas pesadas se clasifican como μ, δ, γ, α o ε, y, respectivamente, definen anticuerpos de isotipo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. En las cadenas ligeras y las cadenas pesadas, las regiones variables y las regiones constantes están conectadas por una región "J" que consiste en aproximadamente 12 o más aminoácidos. La cadena pesada también contiene una región "D" con aproximadamente 3 o más aminoácidos. Cada cadena pesada contiene una región variable (V_H) y una región constante (C_H), que consiste en 3 dominios (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}). Cada cadena ligera contiene una región variable (V_L) y una región constante (C_L), que consiste en un dominio C_L . La región constante puede mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedante, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el componente del complemento 1q (C1q) del sistema del complemento clásico. V_H y V_L también se pueden subdividir en regiones con alta variabilidad (denominadas región determinante de complementariedad (CDR)), que están separadas por regiones relativamente conservativas denominadas regiones estructurales (FR). Desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, cada V_H y V_L se compone de 3 CDR y 4 FR, en el orden de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables (V_H y V_L) de la cadena pesada y la cadena ligera forman el sitio de unión del anticuerpo. La distribución de aminoácidos en las regiones o dominios sigue las definiciones de Kabat en Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health Bethesda, MD (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk (1987) Mol. Biol., 196:901-917; o Chothia et al. (1989) Nature, 342:878-883. El término "anticuerpo" no está restringido por ningún método particular de producción de los mismos. Por ejemplo, incluye, en particular, anticuerpos recombinantes, anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Los anticuerpos pueden ser de diferentes isotipos, por ejemplo anticuerpos IgG (tales como los subtipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE o IgM.

Como se utiliza en esta invención, la expresión "fragmentos de unión a antígeno" se refiere a un polipéptido que contiene fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, que mantiene la capacidad de unirse específicamente al mismo antígeno y/o de competir con el anticuerpo de longitud completa para unirse al antígeno, que también se denomina "la porción de unión al antígeno". Véase Fundamental Immunology, Cap. 7 (Paul, W., ed. 2, Raven Press, NY (1989)). Los fragmentos de unión a antígeno se pueden generar mediante técnicas de ADN recombinante o mediante la escisión de anticuerpos intactos con enzimas proteolíticas o productos químicos. En algunos casos, los fragmentos de unión a antígeno incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb y CDR, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, y los polipéptidos que contienen al menos una porción de anticuerpo que es suficiente para conferir una capacidad de unión a antígeno específica a los polipéptidos.

En algunos casos, el fragmento de unión a antígeno es un diacuerdo, es decir, un fragmento de anticuerpo dimérico, cuyos dominios V_H y V_L se expresan en una sola cadena polipeptídica; sin embargo, debido al uso de un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con dominios complementarios en otra cadena para generar dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), y Poljak RJ et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)).

Utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos de pericia normal en la técnica (tales como tecnología de ADN recombinante o escisión enzimática/química), se puede obtener un fragmento de unión a antígeno (tales como los fragmentos de anticuerpo descritos anteriormente) a partir de un anticuerpo dado (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales 14C12, 14C12H1L1 proporcionados aquí en la invención), y analizarse para determinar su especificidad de la misma manera que para el anticuerpo completo.

En esta invención, a menos que se especifique lo contrario, el término "anticuerpo" se refiere no sólo al anticuerpo intacto, sino también a los fragmentos de unión a antígeno del anticuerpo.

Como se utiliza en esta invención, los términos "mAb" y "anticuerpos monoclonales" se refieren a un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo que deriva de un grupo de anticuerpos altamente homólogos, es decir, de un grupo de moléculas de anticuerpos idénticas, excepto por mutaciones que pueden surgir espontáneamente. El anticuerpo monoclonal tiene una alta especificidad contra un único epítopo en el antígeno. Los anticuerpos policlonales son diferentes de los anticuerpos monoclonales, ya que contienen al menos 2 o más anticuerpos diferentes, que generalmente reconocen diferentes epítopos en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener con tecnología de hibridoma dada a conocer originalmente por Kohler et al., (Nature, 256: 495, (1975)), así como con tecnología de ADN recombinante (véase la patente de EE. UU. 4.816.567).

Como se utiliza en esta invención, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo o sus fragmentos, derivado de una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor), cuyas CDR o parte de las CDR se sustituyen por las regiones CDR de un anticuerpo no humano (anticuerpo donante), en el que el anticuerpo donante puede ser un anticuerpo no humano (por ejemplo, ratones, ratas o conejos) con especificidad, afinidad de unión o reactividad predictivas. Además, algunos restos de aminoácidos de la región estructural (FR) del anticuerpo receptor también pueden sustituirse por los restos de aminoácidos correspondientes de la fuente no humana, o sustituirse por los restos de aminoácidos de otros anticuerpos para mejorar u optimizar aún más el rendimiento del anticuerpo. Para obtener

más detalles sobre los anticuerpos humanizados, véase, por ejemplo, Jones, et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992); y Clark, *Immunol. Today*, 21: 397-402 (2000).

- 5 Como se utiliza en esta invención, el término "aislado" significa obtenido por medios artificiales en el estado natural. Si existe un determinado tipo de materia o componente "aislado" en la naturaleza, puede deberse al cambio en su entorno natural, o estar aislado del entorno natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido en existencia natural en un animal vivo se denominará "aislado" si se separó con alta pureza en el mismo estado natural. El término "aislado" no excluye la existencia de material artificial o sintético, u otras impurezas que no afecten a la actividad.
- 10 Como se utiliza en esta invención, el término "vector" se refiere a un vehículo de administración de ácido nucleico que puede insertarse con un polinucleótido. El vector que puede tener la proteína que está codificada por el polinucleótido insertado expresado se denomina vector de expresión. Los vectores pueden insertarse en la célula hospedadora mediante transformación, transducción, o transfección, de modo que las sustancias genéticas transportadas por el vector pueden expresarse en la célula hospedadora. Los vectores son bien conocidos por el personal técnico en el campo, incluyendo, pero sin limitarse a: plásmido; fásmido; cósmido; cromosoma artificial, tal como cromosoma artificial de levadura (YAC), cromosoma artificial bacteriano (BAC) o cromosoma artificial derivado de P1 (PAC); fago, tal como fago λ o fago M13, y virus animales, etc. Los virus animales pueden incluir, pero no se limitan a, virus de transcriptasa inversa (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes (por ejemplo, virus del herpes simple), virus de la varicela, baculovirus, virus del papiloma, y virus de la papila (tal como SV40). Un vector puede contener múltiples componentes que controlan la expresión, incluidos, pero sin limitarse a, promotor, factor de iniciación de la transcripción, potenciador, elemento de selección, y gen informador. Además, el vector también puede contener un sitio de iniciación de la replicación.
- 15 Como se utiliza en esta invención, la expresión "célula hospedadora" se refiere a células que pueden importar vectores, incluyendo, pero sin limitarse a, células procariotas tales como *E. coli* y *Bacillus subtilis*, células fúngicas tales como levadura y *Aspergillus*, células de insectos tales como células S2 de drosophila y Sf9, o células animales tales como células de fibroblastos, células CHO, células COS, células NSO, células HeLa, células BHK, células HEK293 o células humanas.
- 20 Como se utiliza en esta invención, la expresión "unión específica" se refiere a una unión no aleatoria entre dos moléculas, tal como la interacción entre el anticuerpo y su antígeno diana. En algunas realizaciones, una unión específica de un anticuerpo a un antígeno significa una afinidad (K_D), por ejemplo menor que aproximadamente 10^{-5} M, en particular, menor que 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, o menos.
- 25 Como se utiliza en esta invención, el término " K_D " se refiere a la constante de equilibrio de disociación de la interacción específica entre el anticuerpo y el antígeno, para describir la afinidad de unión entre anticuerpos y antígenos. Cuanto menor sea la constante de disociación de equilibrio, más estrechamente se une el anticuerpo al antígeno, mayor es la afinidad entre el anticuerpo y el antígeno. Normalmente, los anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales 14C12, 14C12H1L1 en la presente invención) se unen a antígenos (por ejemplo, proteína PD1) con una K_D menor que aproximadamente 10^{-5} M, por ejemplo menor que 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, o menos. La K_D se puede medir mediante cualquier método bien conocido por el personal técnico en el campo, por ejemplo utilizando el Fortebio Octet System. Como se utiliza en esta invención, las expresiones "anticuerpo monoclonal" y "mAb" tienen el mismo significado, y se utilizan indistintamente; las expresiones "anticuerpo policlonal" y "PcAb" tienen el mismo significado, y se utilizan indistintamente; los términos "polipéptido" y "proteína" tienen el mismo significado, y se utilizan indistintamente. También en la presente invención, los aminoácidos se representan habitualmente mediante abreviaturas de una o tres letras conocidas en este campo. Por ejemplo, Alanina puede representarse como A o Ala.
- 30 Como se utilizan en esta invención, los términos "hibridoma" y "línea celular de hibridoma" se pueden utilizar indistintamente, y cuando se mencionan aquí, incluyen las células de subclón y progenie del hibridoma. Por ejemplo, cuando se menciona aquí, la línea celular de hibridoma LT003 también incluye las células de subclón y progenie de LT003.
- 35 Como se utiliza en esta invención, la expresión "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo y/o un excipiente farmacéutico y/o fisiológicamente compatible con los sujetos y los ingredientes activos, y está ampliamente reconocido en el campo de la presente invención (Remington's Pharmaceutical Sciences. Editado por Gennaro AR, 19.^a ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), incluyendo, pero no se limitan a: ajustadores del pH, tensioactivos, adyuvantes, y potenciadores de la fuerza iónica. Por ejemplo, los ajustadores del pH incluyen, pero no se limitan a, una disolución amortiguadora de fosfato; los tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos catiónicos, aniónicos o no iónicos tal como Tween-80; los potenciadores de la fuerza iónica incluyen, pero no se limitan a, cloruro de sodio.
- 40 Como se utiliza en esta invención, la expresión "dosis efectiva" se define como una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. Por ejemplo, la dosis eficaz de
- 45
- 50
- 55
- 60

Como se utiliza en la presente invención, la expresión "dosis efectiva" se define como una cantidad de un agente terapéutico suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. Por ejemplo, la dosis eficaz de

prevención (por ejemplo, para el cáncer) es la cantidad para prevenir, detener o retrasar la aparición de enfermedades (por ejemplo, cáncer); la dosis eficaz de tratamiento es la cantidad para curar, o al menos detener parcialmente, la enfermedad y sus complicaciones en pacientes con la enfermedad. La determinación de dicha dosis eficaz está completamente dentro del alcance de las capacidades del personal técnico en el campo. Por ejemplo, la dosis eficaz de tratamiento dependerá de la gravedad de la enfermedad, el estado general del sistema inmunológico del paciente, los antecedentes generales de los pacientes, tales como la edad, el peso y el sexo, el método de administración de dicho fármaco, y otros tratamientos concomitantes, etc.

Efectos de la invención

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención, especialmente 14C12H1L1, son capaces de unirse específicamente a PD1, bloqueando eficazmente la unión de PD1 a PDL1 y aliviando la inmunosupresión de PD1 para activar los linfocitos T. En el que, el anticuerpo anti-PD1 14C12H1L1 puede inducir las secreciones de IFN- γ e IL-2 mucho mejor que el anticuerpo de control 5C4 (5C4: anticuerpo anti-PD1 de Medarex Inc.: Alan J. Korman, et al., Human monoclonal antibodies to programmed death 1 (PD1) and methods for treating cancer using anti-PD1 antibodies alone or in combination with other immunotherapeutics, patente de los Estados Unidos, patente n.º US 8008449 B2). Los anticuerpos monoclonales de la presente invención, especialmente 14C12H1L1, tienen un efecto antitumoral equivalente al fármaco aprobado Nivolumab para la misma diana. Los anticuerpos de la presente invención tienen el potencial de convertirse o prepararse como medicamentos para la prevención y/o el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, melanoma, leucemia o anemia.

Descripción de las figuras

Figura 1: Resultados de SDS-PAGE del anticuerpo monoclonal humanizado 14C12H1L1. De izquierda a derecha: 1. 1 μ g de anticuerpo en amortiguador de carga no reducida; 2. 1 μ g de anticuerpo en amortiguador de carga reducida; 5 μ l de marcador; 3. 1 μ g de BSA.

Figura 2: Cinética de unión del anticuerpo 14C12.

Figura 3: Cinética de unión del anticuerpo 14C12H1L1.

Figura 4: Cinética de unión del anticuerpo 5C4.

Figura 5: Resultados de ELISA de la unión de 14C12H1L1 y 5C4 a PD1.

Figura 6: Resultados de ELISA de competencia de la unión de 14C12H1L1 y 5C4 a PD1 frente a PDL1.

Figura 7: EC₅₀ de la unión de 14C12H1L1 a PD1 en la superficie de las células 293T-PD1.

Figura 8: Actividad de unión de 14C12H1L1 al antígeno de superficie de células T PD1.

Figura 9: Efecto de 14C12H1L1 sobre la secreción de IFN- γ de linfocitos mixtos.

Figura 10: Efecto de 14C12H1L1 sobre la secreción de IL-2 de linfocitos mixtos.

Figura 11: Efecto de 14C12H1L1 sobre la secreción de citocina IL-2 inducida por la mezcla de PBMC, MDA-MB-231 y células Raji.

Figura 12: Efecto de 14C12H1L1 sobre el crecimiento tumoral del modelo tumoral MC38 en ratones HuGEMM PD-1.

La línea celular de hibridoma LT003 se conservó en el Centro de Colección de Cultivos Típicos de China (CCTCC) en la Universidad de Wuhan, Wuhan, China 430072, el 16 de junio de 2015 con el número de acceso de depósito CCTCC: C2015105

Descripción detallada de la invención

A continuación se describirá en detalle la invención. Como apreciará un experto en la técnica, los siguientes ejemplos se utilizan únicamente para la descripción de la invención, y no deben considerarse como limitativos del alcance de la invención. Los casos sin las descripciones específicas de técnicas o condiciones se llevaron a cabo según la bibliografía en el campo (por ejemplo, Guide to Molecular Cloning, escrita por J Sambrook, et al, traducida por Peitang Huang, et al, tercera edición, Science Press) o según el manual de instrucciones del producto. Los reactivos o instrumentos sin fabricante especificado fueron todos productos convencionales disponibles comercialmente.

En los ejemplos que se muestran a continuación, las células T utilizadas procedían de Akeso Biopharma, Inc.; los ratones BALB/C se adquirieron en Guangdong Medical Laboratory Animal Center. Los ratones PD-1 HuGEMM utilizados procedían de Nanjing Galaxy Biopharma Co., Ltd.; las células MC38 procedían de Shanghai Fudan IBS Cell Center; el fármaco comercializado para la misma diana, Nivolumab (Opdivo®), utilizado procedía de Bristol-Myers Squibb Company.

Ejemplo 1: Adquisición de la línea celular de hibridoma LT003 y preparación del anticuerpo monoclonal 14C12

1. Establecimiento de la línea celular de hibridoma LT003

Se utilizó la proteína de fusión PD1-mFc (PD1: Proteína de muerte celular programada 1, NCBI GenBank ID:NP_005009.2) como antígeno, y los esplenocitos de ratones BALB/C inmunizados (adquiridos en el Guangdong Medical Laboratory Animal Center) y la células de mieloma de ratón se fusionaron en células de hibridoma mediante el método establecido actualmente (por ejemplo, Stewart, SJ, "Monoclonal Antibody Production", en Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds.GC. Howard y DR Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

La microplaca se revistió con PD1-mFc como antígeno, y las células de hibridoma se examinaron mediante ELISA indirecto para obtener células de hibridoma que segregan nuevos anticuerpos que se unen específicamente a PD1.

Las líneas celulares de hibridoma capaces de segregar anticuerpos monoclonales que se unen a PD1 se seleccionaron mediante ELISA de competencia contra la proteína de fusión del ligando PDL1-hFc (PDL1: Ligando de muerte programada 1, NCBI Genebank ID:NP_054862.1), y se obtuvieron líneas celulares de hibridoma estables mediante el método de dilución limitada, y entonces se obtuvieron líneas celulares LT003 estables mediante el método de dilución limitada (el anticuerpo monoclonal segregado por LT003 se denomina 14C12).

La línea celular de hibridoma LT003 (PD1-14C12) se conservó en el Centro de Colección de Cultivos Típicos de China (CCTCC) en la Universidad de Wuhan, Wuhan, China 430072, el 16 de junio de 2015 con el número de acceso de depósito CCTCC: C2015105.

2. Preparación del anticuerpo monoclonal 14C12

La línea celular LT003 de la presente invención se cultivó durante 7 días utilizando medio IMDM que contenía 10% de suero fetal bovino con bajo contenido de IgG, y después el sobrenadante del cultivo celular se cosechó y purificó para obtener el anticuerpo 14C12.

Ejemplo 2: Adquisición de secuencias de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo monoclonal 14C12

El ARNm se extrajo de la línea celular de hibridoma LT003 preparada en el Ejemplo 1 anterior según el manual del kit de reactivo de extracción de ARN total de células/bacterias (Tiangen, producto n.º DP430).

Se sintetizó ADNc según el manual del Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit, y se llevó a cabo la amplificación por PCR.

La clonación de TA se llevó a cabo directamente utilizando los productos de amplificación por PCR según las instrucciones del kit de clonación pEASY-T1 (Transgen CT101).

Los productos de clonación de TA se secuenciaron, y se obtuvieron los siguientes resultados:

Resultados de la secuenciación de ADN de VH: (354 pb)

```
GAGGTCAAACCTGGTGAGAGCGGCCGGCTGGTGAAGCCGGCGGGTCACT
GAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTAGCTCCTACGACATGTCATGGGT
GAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCTACTATCAGCGGAGGCAGGG
CGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTACAATTAGTCGGGATAA
CGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTC
TGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAACATGGTTGCCTATTGGGGACAGGGC
ACCCTGGTGACAGTCTCTGCC ( SEQ ID NO: 1 )
```

Secuencia de proteína codificada: (118 aa)

EVKLVESGGVLKPGGSLKLSCHAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGGG

RYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGT

LTVSA (SEQ ID NO: 2)

Resultados de la secuenciación de ADN de V_L: (318 pb)

5

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGCGAGCGA
 GTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACTGTCTGGTTCA
 GCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAATAGACTGGTG
 GACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGCAGGATTACTCCCTGAC
 CATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGATG
 AGITCCCTCTGACCTTGGAGCAGGCACAAACTGGAAGT (SEQ ID NO: 3)

Secuencia de proteína codificada: (106 aa)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVD

GVPSRFSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL (SEQ ID NO:

10 4)

2. Preparación del anticuerpo monoclonal recombinante 14C12 (Re)

15 La secuencia de ADNc de cadena pesada (la secuencia de la región variable es SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ADNc de cadena ligera (la secuencia de la región variable es SEQ ID NO: 3) de 14C12 (Re) se clonaron por separado en el vector pUC57simple (proporcionado por GenScript Biotech Corp.) (sitios de escisión enzimática: XbaI y BamHI), y se obtuvieron los plásmidos pUC57simple-14C12H y pUC57simple-14C12L, respectivamente.

20 Los plásmidos pUC57simple-14C12H y pUC57simple-14C12L, respectivamente, se escindieron enzimáticamente (HindIII y EcoRI), y después las cadenas pesada y ligera recuperadas de la electroforesis se subclonaron en el vector pcDNA3.1, ambos plásmidos recombinantes se extrajeron, y se cotransfectaron células 293F.

25 Después de 7 días de cultivo celular, el sobrenadante del cultivo celular se centrifugó mediante centrifugación de alta velocidad y se filtró mediante filtración a vacío con membrana microporosa y se cargó en la columna HiTrap MabSelectSuRe, y después el anticuerpo se eluyó con amortiguador de elución en una etapa, y entonces se hizo pasar por la columna de desalinización HiTrap y se recuperó en amortiguador PBS, y entonces el anticuerpo recombinante 14C12 (Re) se obtuvo después de una purificación adicional.

30 Como lo validó el ensayo de actividad de unión de ELISA, el anticuerpo recombinante 14C12 (Re) tuvo una actividad de unión equivalente al anticuerpo 14C12, y por lo tanto puede usarse en el diseño de humanización de anticuerpos posterior.

Ejemplo 3: Diseño de secuencias de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo humanizado 14C12H1L1

35 1. Diseño de secuencias de cadena ligera y cadena pesada del anticuerpo humanizado 14C12H1L1

40 Según la estructura cristalina tridimensional de la proteína PD1 (Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3):704-6)) y las secuencias del anticuerpo 14C12 obtenidas en el Ejemplo 2, a través del modelado de anticuerpos por computadora, se diseñó la mutación de aminoácidos según el modelo, y las secuencias de la región variable del anticuerpo 14C12H1L1 (la región constante de la cadena pesada es la región C de la cadena gamma-1 de Ig, ACCESO:P01857; la región constante de la cadena ligera es la región C de la cadena kappa de Ig, ACCESO:P01834) se obtuvieron de la siguiente manera:

45 Secuencia de ADN de la región variable de cadena pesada: (354 pb)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGAGGGCTGGTGCAGCCGGCGGGTCACT
GCGACTGAGCTGCCAGCTCCGGATTCGCCTTAGCTCCTACGACATGTCCCTGGGT
GCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGC
AGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTCACAATCTAGAGATAA
CAGTAAGAACAAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGAAGCATGGTTGCCTATTGGGGCAGGG
AACCTGGTGACAGTCTCTAGT (SEQ ID NO: 5)

Secuencia de proteína codificada: (118 aa)

EVQLVESGGGVQPGSLRLSCAASGFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGG
RYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQQ

5 TLTVVSS (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de ADN de la región variable de cadena ligera: (321 pb)

GACATTCA GATGACTCAGAGCCCCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGC
GTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTCA
GCAGAACGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGT
TCTGGAGTCCCAGTCGGTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTTGAC
CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATG
AGTTCCCACTGACCTTGGCGCCGGACAAACTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 7)

10

Secuencia de proteína codificada: (107 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSG
VPSRFSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:
8)

15 **Ejemplo 4: Preparación y electroforesis SDS-PAGE del anticuerpo monoclonal humanizado 14C12H1L1**

El ADNc de cadena pesada (la secuencia de la región variable es SEQ ID NO: 5, la región constante de cadena pesada es la región C de la cadena gamma-1 de Ig, ACCESO: P01857) y el ADNc de cadena ligera (la secuencia de la región variable es SEQ ID NO: 7, la región constante de cadena ligera es la región C de la cadena kappa de Ig, ACCESO: P01834) de 14C12H1L1 se clonaron por separado en el vector pUC57simple (proporcionado por GenScript Biotech Corp.) (sitios de escisión enzimática : XbaI y BamHI) para obtener los plásmidos pUC57simple-14C12H1 y pUC57simple-14C12L1, respectivamente. Estos plásmidos se subclonaron en el vector pcDNA3.1 respectivamente (sitios de escisión enzimática: XbaI y BamHI), ambos plásmidos recombinantes se extrajeron, y se cotransfектaron células 293F.

25

Después de 7 días de cultivo celular, el cultivo celular se centrifugó mediante centrifugación de alta velocidad y se filtró mediante filtración a vacío con membrana microporosa y se cargó en la columna HiTrap MabSelectSuRe, y después el anticuerpo se eluyó con amortiguador de elución en una etapa, y entonces se hizo pasar por la columna de desalinización HiTrap y se recuperó en amortiguador PBS, y se purificó aún más para obtener el anticuerpo recombinante 14C12H1L1, que se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE.

30

Los resultados se muestran en la Figura 1, la proteína diana reducida apareció aproximadamente a 24,5 kD y 49 KD, y la proteína diana no reducida apareció aproximadamente a 147 kD.

35

Ejemplo 5: Medidas cinéticas de los anticuerpos

La cinética de unión del anticuerpo 14C12 y del anticuerpo humanizado 14C12H1L1 al antígeno PD1 se midió mediante el Fortebio Octet System.

- 5 1. La proteína PD1-mFc se escindió con la proteasa TEV, y el antígeno PD1 se obtuvo mediante purificación en columna.
- 10 2. El antígeno PD1 (concentración de 1 µg/ml) marcado con biotina se inmovilizó en la superficie del sensor SA y se equilibró en amortiguador PBST, y entonces se unió a los anticuerpos 14C12, 14C12H1L1 y 5C4, y los anticuerpos se diluyeron con cada dilución tres veces con respecto a la anterior desde 200 nM. La disociación del antígeno y el anticuerpo también se realizó en PBST.

15 La cinética de unión de los anticuerpos 14C12, 14C12H1L1 y 5C4 se muestra en la Tabla 1 y las Figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Los resultados mostraron que tanto 14C12 como 14C12H1L1 tenían buenas afinidades por PD1, con una afinidad mayor que la de 5C4.

Tabla 1: Parámetros dinámicos del anticuerpo 14C12.

Nombre del anticuerpo	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	Error de K _o	K _{dis} (1/s)	Error de K _{dis}
14C12	1,81E-11	3,38E+05	8,23E+03	6,12E-06	1,04E-05
14C12H1L1	2,42E-11	3,17E+05	5,90E+03	7,66E-06	8,70E-06
5C4	6,46E-10	5,63E+05	1,38E+04	3,63E-04	9,77E-06

K_D: Constante de disociación;
K_{on}: Tasa de unión de antígeno y anticuerpo;
K_{dis}: Tasa de disociación de antígeno y anticuerpo;
K_D = K_{dis}/K_{on}.

Ejemplo 6: Actividad de unión del anticuerpo y el antígeno PD1 medida mediante ELISA indirecto

- 20 Las actividades de unión de los anticuerpos 14C12H1L1 y 5C4 a PD1 se midieron por separado mediante ELISA indirecto de la siguiente manera:
- 25 Después de incubar con PD1-mFc a 4 °C durante la noche, la microplaca se bloqueó con BSA al 1% a 37 °C durante 2 h, y entonces se añadieron los anticuerpos por separado y se incubaron a 37 °C durante 30 min, y después se añadió el anticuerpo secundario marcado con HRP (anti-IgG humana de cabra (H+L)) (Jackson, 109-035-088), y entonces se añadió TMB (Neogen, 308177) para reaccionar durante 5 min, y la absorbancia se leyó a la longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas.
- 30 Los resultados de unión de los anticuerpos 14C12H1L1 y 5C4 al antígeno PD1 se mostraron en la Figura 5. Como se muestra en la Figura 5, tanto el anticuerpo 14C12H1L1 como 5C4 pueden unirse a la proteína PD1 de manera efectiva con dependencia de la dosis. Las intensidades de absorbancia a diferentes dosis se mostraron en la Tabla 2. A través de la simulación de curvas utilizando análisis cuantitativos de valores de absorbancia, se determinó que la EC50 de la unión de 14C12H1L1 y 5C4 con PD1 era 0,032 nM y 0,043 nM, respectivamente.
- 35

Tabla 2: Intensidades de absorbancia de la unión de 14C12H1L1 y 5C4 a PD1

Concentración de anticuerpo (µg/ml)	Recubrimiento de antígeno: PD1-mFc (0,5 µg/ml)			
	14C12H1L1	5C4		
1	2,970	2,954	2,959	2,991
0,3	2,886	2,961	2,978	3,079
0,1	2,864	2,868	2,838	2,926
0,03	2,674	2,669	2,617	2,659
0,01	2,222	2,201	1,981	2,221
0,003	1,383	1,464	1,169	1,222
0,001	0,676	0,736	0,527	0,548
0	0,062	0,062	0,065	0,073
Anticuerpo secundario	Anticuerpo secundario marcado con HRP (anti-IgG humana de cabra)			

Ejemplo 7: Actividades de unión de anticuerpos al antígeno PD1 contra PDL1 mediante ELISA de competencia

- 40 Las actividades de unión del anticuerpo humanizado 14C12H1L1 y 5C4 al antígeno PD1 contra PDL1 se midieron mediante ELISA de competencia de la siguiente manera:

Después de incubar con PD1-hFc a 4 °C durante la noche, la microplaca se bloqueó con BSA al 1% durante 2 h, y los anticuerpos 14C12H1L1 y 5C4 con diferentes concentraciones (consulte la Tabla 3 para conocer las concentraciones diluidas) se mezclaron con PDL1-mFc durante 10 min, y las mezclas se incubaron a 37 °C durante 30 min y a continuación se añadieron los anticuerpos secundarios marcados con enzima antihumana y antirratón correspondientes respectivamente, y se incubaron a 37 °C durante 30 min. La absorbancia a la longitud de onda de 450 nm se leyó en un lector de microplacas.

Los resultados de unión de los anticuerpos 14C12H1L1 y 5C4 al antígeno PD1 se mostraron en la Figura 6. Como se muestra en la Figura 6, el anticuerpo 14C12H1L1 puede competir contra PDL1 y unirse a la proteína PD1 de manera efectiva con dependencia de la dosis. Las intensidades de absorbancia a diferentes dosis se mostraron en la Tabla 3. A través de la simulación de curvas utilizando análisis cuantitativos de valores de absorbancia, se determinó que la EC50 de la actividad de unión de 14C12H1L1 y 5C4 era 1,322 nM y 1,199 nM, respectivamente.

Tabla 3: Unión competitiva de 14C12H1L1 y 5C4 a PD1 contra PDL1

Recubrimiento de antígeno	PD1-mFc 0,5 µg/ml			
Concentración de anticuerpo/gradiente de dilución	14C12H1L1		5C4	
1,5 µg/ml	0,062	0,064	0,070	0,075
1:3	0,069	0,064	0,081	0,086
1:9	0,363	0,305	0,372	0,269
1:27	1,727	1,543	1,429	1,604
1:81	1,892	1,752	1,766	1,881
1:243	1,984	2,029	2,045	2,005
1:729	1,937	1,978	1,934	1,954
0	1,870	1,977	1,933	1,977
Ligando	PDL1-mFc 0,3 µg/ml			
Anticuerpo secundario	Anticuerpo secundario antirratón marcado con HRP			

Ejemplo 8: Actividad de unión de anticuerpos al antígeno de superficie celular PD1 mediante citometría de flujo

Se construyeron células hospedadoras 293T que expresaban el antígeno PD1, y se marcaron con el anticuerpo humanizado 14C12H1L1 preparado en la presente invención (véase el Ejemplo 4). La capacidad del anticuerpo 14C12H1L1 para unirse específicamente al antígeno de superficie celular en su conformación nativa se analizó y validó mediante citometría de flujo.

1. Construcción de la célula hospedadora 293T que expresa el antígeno PD1

Las etapas específicas fueron las siguientes:

Construcción de la célula hospedadora 293T que expresa el antígeno PD1: las células 293T se transfecaron con el vector pLenti6.3-PD1 que contiene PD1 (el vector pLenti6.3 se adquirió de Invitrogen Corporation) según el manual de LipofectaminTransfection Kit (adquirido de Invitrogen Corporation), para obtener el conjunto estable de 293T-PD1 que expresa PD1 mediante detección.

2. Unión de anticuerpos al antígeno de superficie de células 293T-PD1

35 Marcaje de anticuerpos y citometría de flujo: Las 293T-PD1 obtenidas mediante la etapa anterior se digirieron con tripsina y se distribuyeron en tubos que contenían 2×10^5 células cada uno. Los anticuerpos PD1 se diluyeron utilizando amortiguador PBS (BSA al 1%) a concentraciones de 50 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 0,1 nM y 0,01 nM, y se añadieron a los tubos y se incubaron durante 2 h en hielo con células 293T que expresaban PD1. A cada tubo se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario antihumano de cabra marcado con FITC (1:500), y se incubó en hielo durante 1 h. Después de lavar con PBS 3 veces, las células se resuspendieron en 300 µl de PBS, y las señales de fluorescencia se midieron en el citómetro de flujo utilizando el canal FITC.

45 Los resultados de la unión del anticuerpo humanizado 14C12H1L1 a las células 293T-PD1 se muestran en la Figura 7. Como se muestra en la Figura 7, el anticuerpo 14C12H1L1 puede unirse a la proteína PD1 diana que se expresa en la superficie de las células hospedadora 293T-PD1 de manera efectiva con dependencia de la dosis. Las intensidades de fluorescencia a diferentes dosis se muestran en la Tabla 4. A través de la simulación de curvas utilizando análisis cuantitativos de intensidades de fluorescencia, se determinó que la EC50 de la unión de 14C12H1L1 con PD1 era 1,89 nM.

50 Tabla 4: Intensidades de fluorescencia de la unión de 14C12H1L1 al antígeno de superficie de 293T-PD1 detectadas por citometría de flujo

Concentración (nM)	0,01	0,1	1	5	10	50
Intensidad de fluorescencia	8,32	20,31	174,62	579,41	686,49	669,54

Ejemplo 9: Actividad de unión del anticuerpo al antígeno de superficie de células T PD1 mediante citometría de flujo

5 Las PBMC se aislaron mediante Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Lote n.º: 171440-02), se aislaron posteriormente para obtener células CD4⁺, y las células se estimularon con PHA (Shanghai Shenqi Biotech Co., Ltd, 50 µl/ml) durante tres días, y después se lavaron una vez con PBS, y se añadieron anticuerpos a diferentes concentraciones y se incubaron en hielo durante 1,5 h. A continuación, las células se lavaron con PBS una vez después de la incubación, y el anticuerpo secundario antihumano de cabra marcado con FITC (Jackson immunoresearch lot. 102155) se añadió y se incubó en hielo en la oscuridad durante 1 h, y tras lavar con PBS una vez, las señales de fluorescencia se midieron en el citómetro de flujo.

10 Los resultados de la unión del anticuerpo humanizado 14C12H1L1 a las células T se muestran en la Figura 8. Evidentemente, el anticuerpo 14C12H1L1 puede unirse a la proteína PD1 en la superficie de células T de manera efectiva con dependencia de la dosis.

15 **Ejemplo 10: Reacción linfocítica mixta: secreción de citocinas IFN-γ, IL-2**

20 Las PBMC se aislaron mediante Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Lote n.º: 171440-02), y las PBMC aisladas se indujeron con IL-4 (Peprotech K2513, 1000 U/ml) y GM-CSF (Peprotech H1513, 1000 U/ml) durante 6 días, y entonces se añadió TNF-α (Peprotech G1513, 200 U/ml) para inducir durante 3 días para obtener células DC.

25 Las células T se aislaron de PBMC y se mezclaron con las células DC obtenidas anteriormente en la relación 10:1 para cultivarlas junto con los anticuerpos 14C12H1L1, 5C4 y hlgG (hlgG como control de isotipo) en diferentes relaciones durante 5-6 días. Las secreciones de IFN-γ e IL-2 se midieron con los kits de reactivos de ELISA correspondientes (ambos adquiridos de Dakewe) respectivamente.

30 Las secreciones de IFN-γ e IL-2 después de un cultivo mixto de células DC y células T se muestran en las Figuras 9 y Figuras 10. El anticuerpo 14C12H1L1 puede inducir eficazmente las secreciones de IFN-γ e IL-2 con dependencia de la dosis. El anticuerpo 14C12H1L1 puede inducir mayores secreciones tanto de IFN-γ como de IL-2 que el anticuerpo de control 5C4.

Ejemplo 11: Secreción inducida de IL-2

35 Las PBMC aisladas (el mismo método que en el Ejemplo 10) se estimularon con PHA (Shanghai Shenqi Biotech Co., Ltd, 50 µl/ml) durante 3 días, y a continuación las PBMC maduras (5×10^4 células/pocillo) se mezclaron con células Raji (Sucursal de la Academia China de Ciencias de Shanghai) (5×10^4 células/pocillo) y células MDA-MB-231 (ATCC) (1×10^4 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 100 nM de 14C12H1L1 o anticuerpo de control 5C4 o hlgG (hlgG como control de isotipo), y se mezclaron y cultivaron juntos durante tres días. La secreción de IL-2 se detectó con un kit de reactivos de ELISA (adquirido de Dakewe) según las instrucciones del kit.

40 Los resultados de la secreción de IL-2 después del cultivo de células mixtas se muestran en la Figura 11. Como se muestra en la Figura 11, el anticuerpo puede inducir eficazmente a las PBMC a segregar IL-2, y la secreción de IL-2 inducida por 14C12H1L1 es significativamente mayor que la del anticuerpo de control 5C4.

45 **Ejemplo 12: Impacto del anticuerpo 14C12H1L1 en el crecimiento tumoral del modelo tumoral MC38 en ratones HuGEMM PD-1**

50 Se inocularon células tumorales MC38 (1×10^6 células /ratón) por vía subcutánea en el lado derecho de ratones PD-1 HuGEMM (ratones transgénicos PD-1 humana). Cuando el volumen tumoral medio alcanzó aproximadamente 118 mm³, los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos experimentales, con 8 ratones en cada grupo. Los anticuerpos se administraron por vía abdominal. El agrupamiento y las dosis específicas fueron las siguientes:

55 Grupo de control de isotipo (dosis: 8 mg/kg),

55 Grupo de dosis alta de 14C12H1L1 (dosis: 8 mg/kg),

55 Grupo de dosis baja de 14C12H1L1 (dosis: 0,8 mg/kg),

60 Grupo de nivolumab (dosis: 8 mg/kg).

A los 4 grupos anteriores se les inyectaron anticuerpos dos veces por semana, 5 dosis en total. Después de la inyección, se midieron los tamaños de los tumores dos veces por semana.

Los resultados se presentan en la Figura 12.

5 Los resultados indican que:
Los tamaños tumorales en los grupos de Nivolumab, 14C12H1L1 de dosis alta y 14C12H1L1 de dosis baja fueron
10 significativamente más pequeños que los del grupo de control de isotipo estadísticamente ($P < 0,01$, $P < 0,01$, $P <$
0,05, respectivamente). El grupo de 14C12H1L1 de dosis alta (8 mg/kg) mostró un efecto antitumoral estadísticamente
15 significativo en el modelo tumoral MC38 en los ratones HuGEMM PD-1, y tuvo una eficacia equivalente al fármaco
aprobado para la misma diana, Nivolumab (8 mg/kg).

Aunque se han descrito en detalle realizaciones específicas de la presente invención, como lo apreciará un experto
15 en la técnica, estos detalles pueden sufrir diversas modificaciones y sustituciones según todas las enseñanzas que
hemos descrito.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
 - 5 una secuencia de aminoácidos V_H de SEQ ID NO:2 y una secuencia de aminoácidos V_L de SEQ ID NO:4; o
 - una secuencia de aminoácidos V_H de SEQ ID NO:6 y una secuencia de aminoácidos V_L de SEQ ID NO:8.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico o anticuerpo biespecífico.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno contiene regiones no CDR de especies distintas del ratón.
4. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno contiene regiones no CDR de origen humano.
- 20 5. El anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal es producido por la línea celular de hibridoma LT003 conservada en el Centro de Colección de Cultivos Tipo de China (CCTCC) con el n.^º de acceso de depósito CCTCC: C2015105.
- 25 6. Un constructo de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4; o una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, y una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8.
- 30 7. Una línea celular de expresión que comprende el constructo de expresión de la reivindicación 6.
8. Un método para producir el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el método cultivar la línea celular de la reivindicación 7 en condiciones adecuadas y recuperar el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del cultivo celular.
- 35 9. Línea celular de hibridoma LT003, conservada en el Centro de Colección de Cultivos Típicos de China (CCTCC) con el número de acceso de depósito CCTCC: C2015105.
- 40 10. Un conjugado que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y una pareja de conjugación como marcador detectable; preferiblemente en el que la pareja de conjugación comprende isótopos radiactivos, fluoresceína, material luminiscente, sustancias coloreadas, o enzimas.
- 45 11. Un kit de reactivos que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el conjugado de la reivindicación 10; preferiblemente en el que el kit comprende un anticuerpo secundario, que reconoce específicamente el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno; opcionalmente en el que el anticuerpo secundario comprende un marcador detectable, preferiblemente en el que el marcador detectable comprende isótopos radiactivos, fluoresceína, material luminiscente, sustancias coloreadas, o enzimas.
- 50 12. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un conjugado de la reivindicación 10; opcionalmente en la que la composición farmacéutica comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 13. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o conjugado de la reivindicación 10, para uso en la prevención y/o tratamiento de tumores o anemia, o el diagnóstico de tumores o anemia.
- 60 14. El anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o conjugado de la reivindicación 10, para uso en la prevención, tratamiento o diagnóstico de melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de ovario o leucemia.

ES 3 001 154 T3

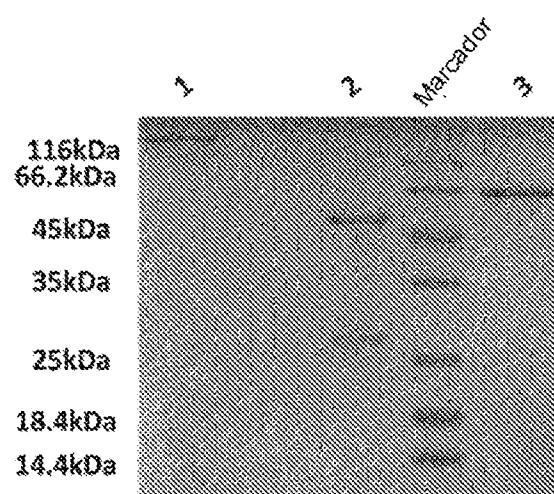


Figura 1

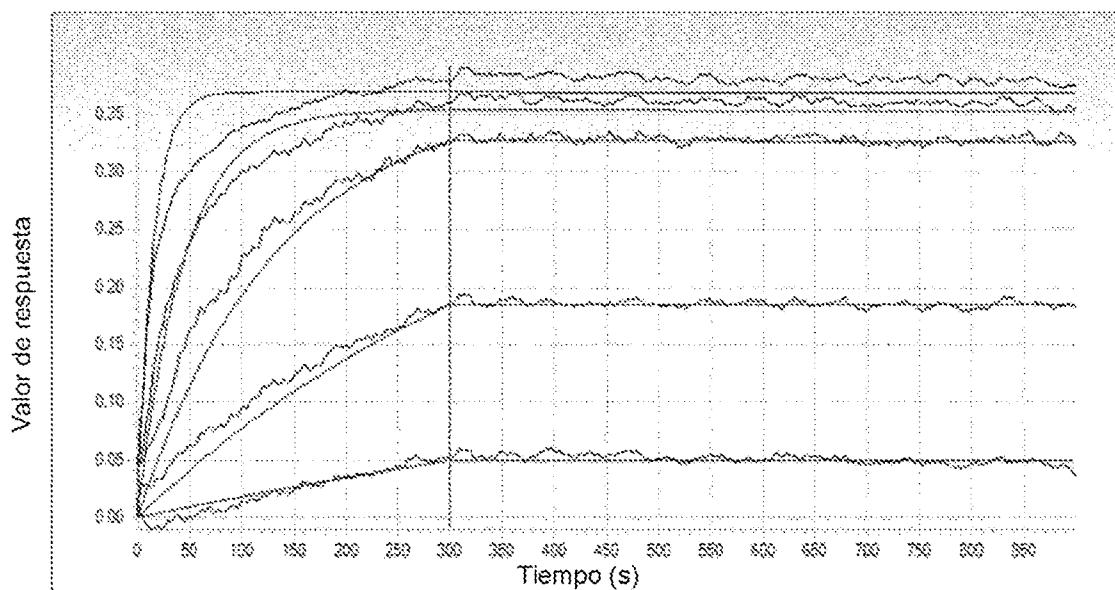


Figura 2

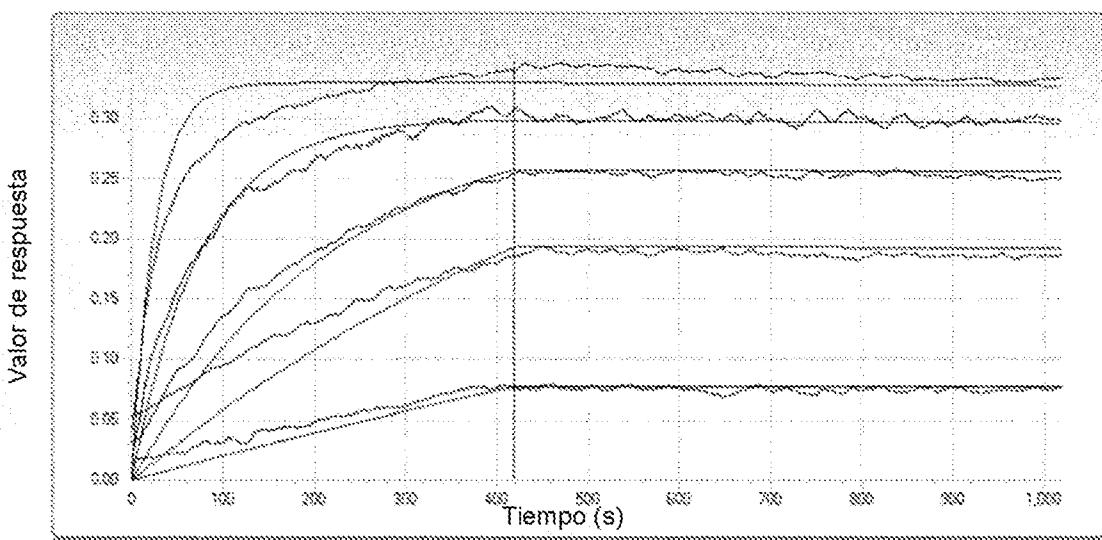


Figura 3

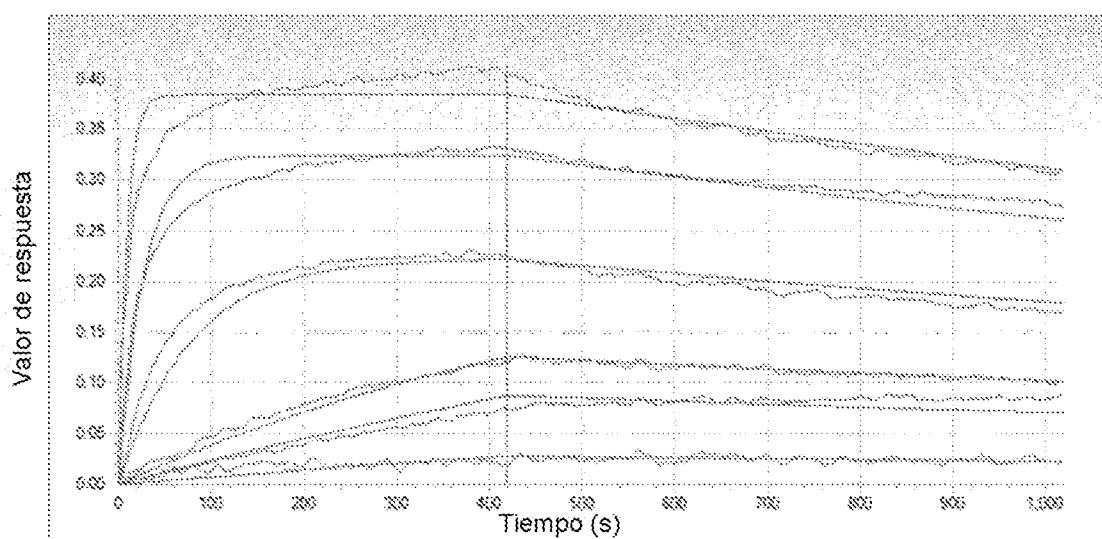


Figura 4

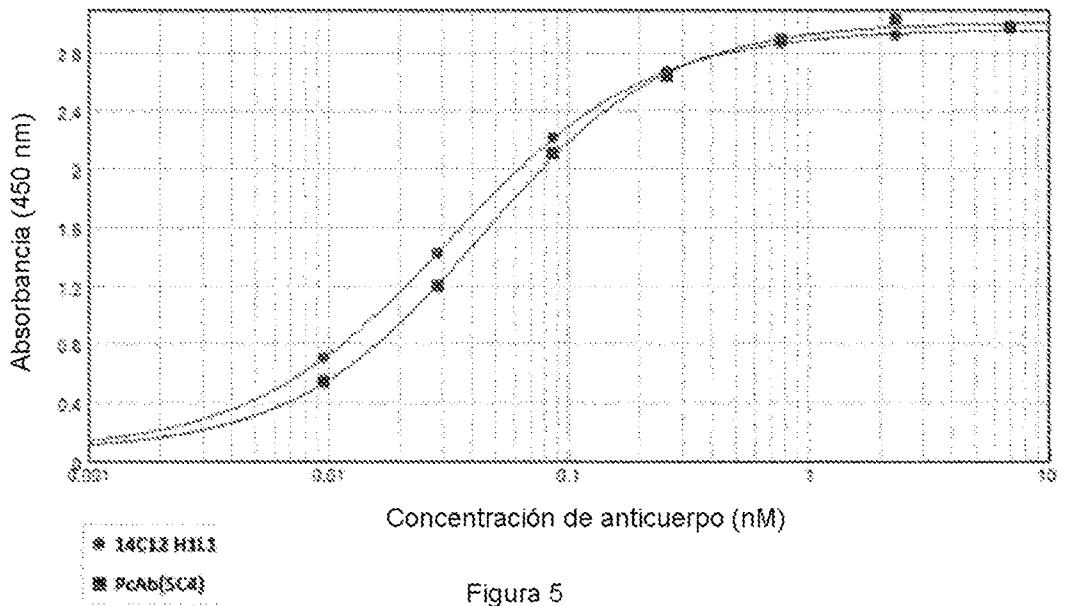


Figura 5

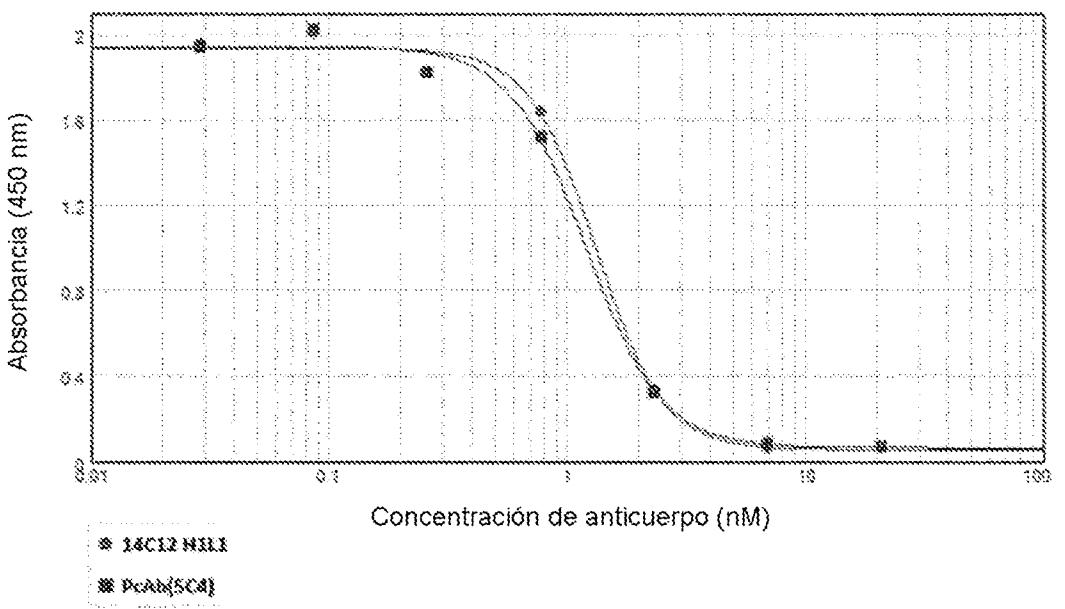


Figura 6

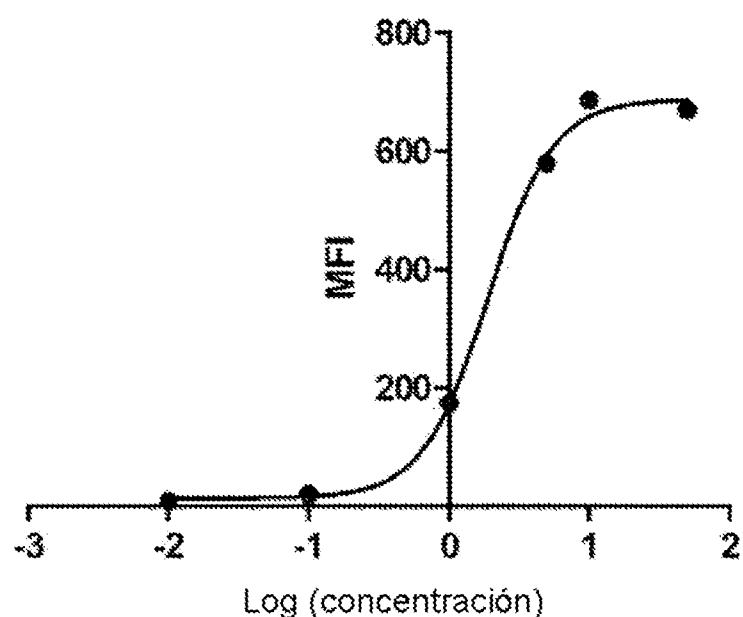


Figura 7

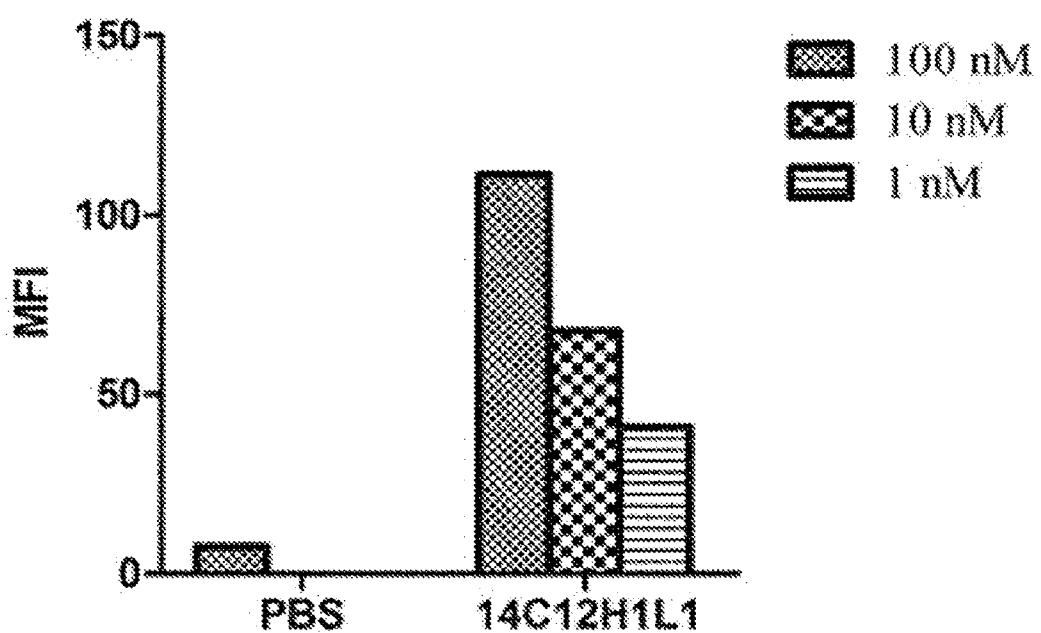


Figura 8

ES 3 001 154 T3

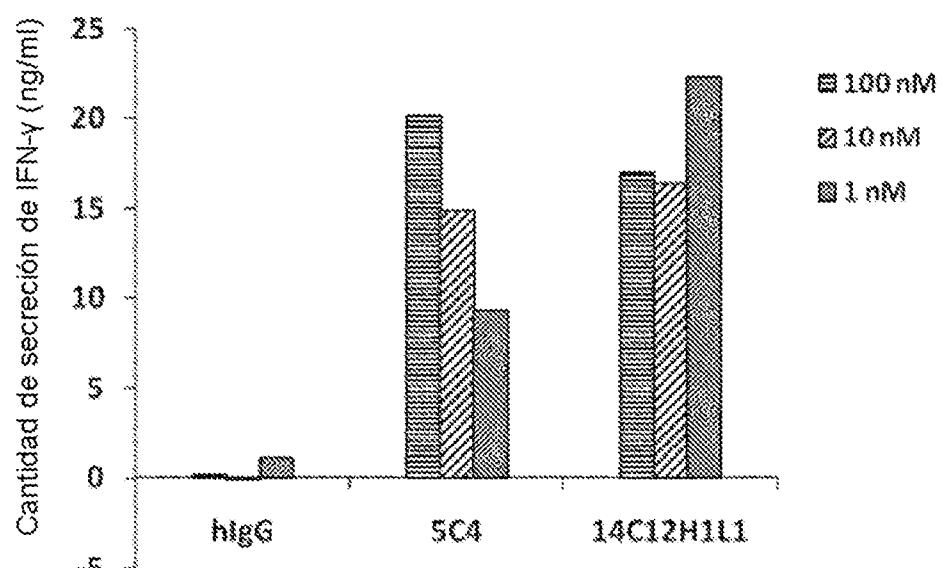


Figura 9

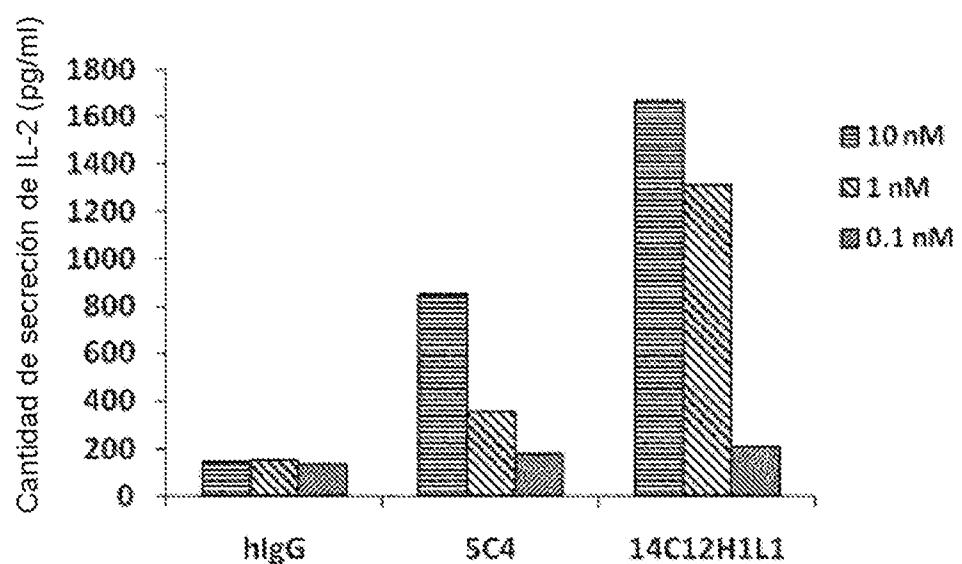


Figura 10

ES 3 001 154 T3

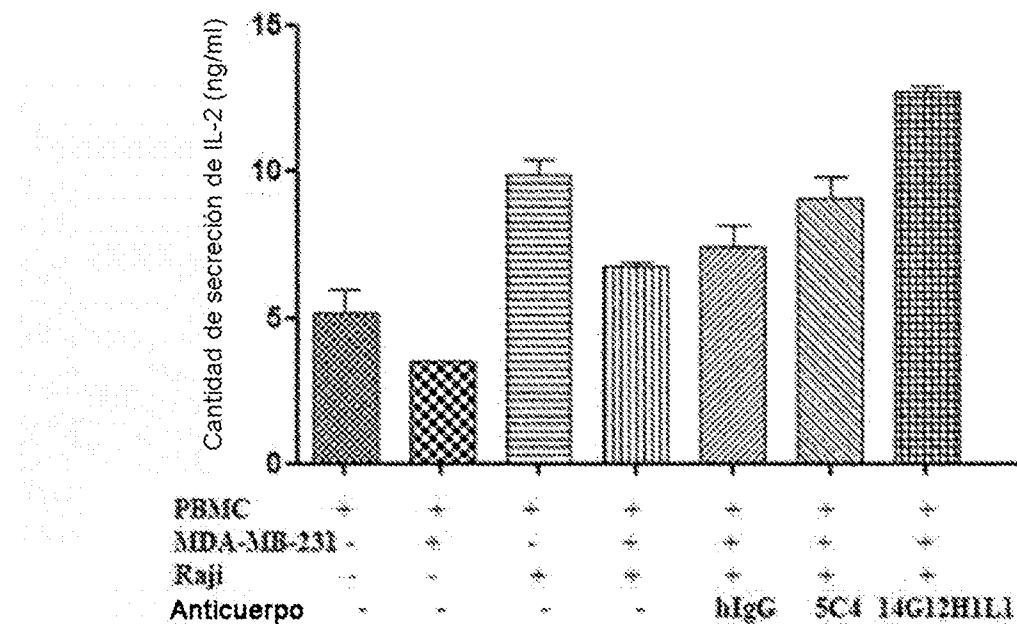


Figura 11

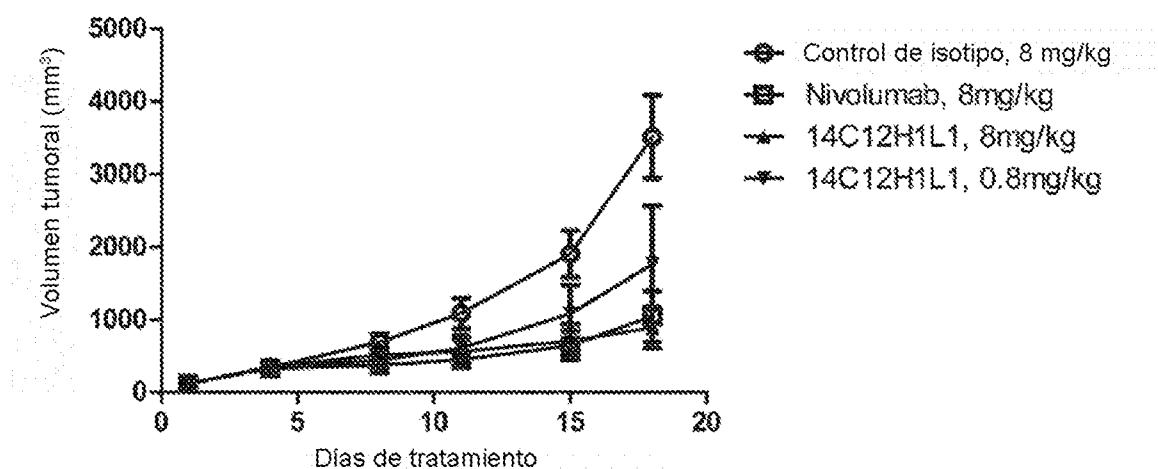


Figura 12