

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 127**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2021 PCT/US2021/033823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.12.2021 WO21242663**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2021 E 21739197 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024 EP 4157876**

54 Título: **Anticuerpos anti-PD-1**

30 Prioridad:

**26.05.2020 US 202063029962 P**

**16.06.2020 US 202063039686 P**

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

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL  
GMBH (100.00%)  
Binger Strasse 173  
55216 Ingelheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**BLAIR, DAVID A.;  
GARAFFA, NICOLE K.;  
GUPTA, PANKAJ;  
GUPTA, PRIYANKA;  
HAN, FEI;  
KARLAK, AARON, TIMOTHY;  
LIU, DONGMEI;  
LORENZ, IVO;  
MBOW, MOUHAMADOU LAMINE;  
MORENO-GARCIA, MIGUEL E.;  
MOZDZIERZ, JOSEPH A.;  
RALPH, KERRY L. M.;  
SHAABAN, ABDULSALAM;  
WHITE, DELLA M.;  
WU, HELEN HAIXIA y  
YANG, GUANGWEI**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

Observaciones:

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

ES 2 994 127 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-PD-1

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general a anticuerpos anti-PD-1 (de muerte celular programada 1) para el uso terapéutico y diagnóstico. Más específicamente, se dan a conocer anticuerpos anti-PD-1 y métodos de utilización para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos caracterizados por células que expresan PD-1. También se dan a conocer composiciones farmacéuticas y kits que comprende los anticuerpos anti-PD-1.

10 Antecedentes de la invención

El factor de muerte celular programada 1, también conocido como PD-1 y CD279 (agrupación de diferenciación 279) es una proteína receptora de superficie celular que se expresa principalmente sobre las células T, aunque también sobre otras células inmunitarias. La ruta de PD-1 es un regulador clave en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria. La proteína funciona como un inhibidor de "punto de control inmunitario", es decir, actúa modulando la actividad de las células en el sistema inmunitario de manera que regula y limita las enfermedades autoinmunitarias. PD-1 presenta dos ligandos: PD-L1 y PD-L2, que interactúan con el receptor de superficie celular. Al unirse, PD-1 induce una señal intracelular, que regula negativamente las respuestas de las células T. Sobre la superficie de las células T activadas, la expresión de PD-1 está regulada positivamente tras el reconocimiento de los antígenos periféricos por las células T; seguidamente, la elevada unión de PD-1 a PD-L1 y PD-L2 se convierte en una etapa clave para la señalización inhibidora cadena abajo. PD-1 también está asociado a una proliferación incrementada de las células T<sub>reg</sub> y una función inmunosupresora potenciada.

Se ha entendido recientemente que muchos cánceres pueden protegerse del sistema inmunitario mediante modificación de los inhibidores de "punto de control inmunitario" y, de esta manera, evitar la detección. Los inhibidores de PD-1, una nueva clase de fármacos que bloquean PD-1, activan el sistema inmunitario para atacar los tumores y se utilizan para tratar determinados tipos de cáncer.

En contraste, las funciones inhibitoras de PD-1 defectuosas también se han asociado a la fisiopatología de las enfermedades de tipo inmunitario, y la expresión de PD-1 o sus ligandos puede estar desregulada o no totalmente activada en determinadas indicaciones autoinmunitarias. De esta manera, la inducción de la activación de PD-1 y la utilización del sistema PD-1/PD-L1 y/o PD-L2 representa un enfoque alternativo a suprimir la respuesta inmunitaria y proporciona tratamientos para diversos trastornos inmunitarios e inflamatorios. El documento n.º WO 2011/110621 A1 describe anticuerpos anti-PD-1 humanizados.

Por lo tanto, existe una necesidad de terapias que induzcan la ruta de PD-1, potencien la función supresora y proporcionen tratamiento para trastornos inmunitarios e inflamatorios controlados por el sistema PD-1/PD-L1 y/o PD-L2. En particular, existe una necesidad de terapéuticos biológicos, tales como anticuerpos, que modulen la interacción entre PD-1 y PD-L1 o PD-L2 sin bloquear dicha interacción.

35 Descripción resumida de la invención

La presente invención se describe en las reivindicaciones. La exposición proporciona anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 humano. En un aspecto de la invención, los anticuerpos de la presente invención no bloquean la interacción entre PD-1 y PD-L1. En un aspecto de la invención, los anticuerpos de la presente invención potencian la interacción entre PD-1 y PD-L1. En un aspecto de la invención, los anticuerpos de la presente invención activan la ruta de señalización de PD-1. En un aspecto de la invención, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos agonistas anti-PD-1. Los anticuerpos de la invención resultan útiles, por ejemplo, para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o trastornos que pueden aliviarse mediante la modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L1, en particular mediante la activación de la ruta de PD-1.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1, en particular un anticuerpo anti-PD-1 monoclonal, por ejemplo un anticuerpo anti-PD-1 monoclonal humanizado, que presenta una o más de las propiedades descritas posteriormente en la presente memoria. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención se une a PD-1 humano recombinante purificado con alta afinidad, por ejemplo 20 nM o menos, por ejemplo 10 nM o menos, por ejemplo 5 nM o menos. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención se une a PD-1 de Cynomolgus recombinante purificado con una afinidad de 50 nM o menos. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención se une selectivamente a PD-1, en particular a PD-1 humano. En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención no se une a PD-1 de ratón, de rata o de conejo. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención no bloquea la unión de PD-L1 a PD-1. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención potencia la unión de PD-L1 a PD-1. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención atenúa la actividad de las células T en un ensayo celular funcional, por ejemplo mediante la inhibición de la producción de IFN $\gamma$ , la inhibición de la producción de IL-17A o la inhibición de la producción de IL-21. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención inhibe la acumulación de células humanas en un modelo de ratón y reduce los

niveles de citoquinas inflamatorias humanas en el modelo de ratón. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención presenta propiedades farmacocinéticas favorables. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención presenta propiedades farmacocinéticas favorables, por ejemplo rendimiento, calidad, estabilidad o solubilidad. En un aspecto, la presente invención proporciona fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 44 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 45 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 1 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 2 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 3 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 43 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 46 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 45 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 1 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 2 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 3 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 47 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 48 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 49 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 4 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 5 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 6 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 50 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 51 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 52 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 7 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 8 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 9 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 53 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 54 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 55 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 10 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 11 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 12 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 56 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 57 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 58 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 13 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 14 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 15 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 59 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 60 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 61 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 16 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 17 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 18 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 62 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 63 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 64 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 19 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 20 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 21 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 65 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 66 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 67 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 22 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 23 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 24 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 68 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 69 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 70 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 25 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 26 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 27 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 71 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 72 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 28 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 29 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30 (L-CDR3),

o  
 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 74 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 75 (H-CDR3), y  
 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 31 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),



o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 78 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 31 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),

o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 79 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 31 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),

o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 76 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 164 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 31 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),

o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 79 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 165 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 166 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),

o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 78 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 165 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 166 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),

o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 79 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3), y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 165 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 167 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3).

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende cualquiera de:

la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 74 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 75 (H-CDR3),

la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 76 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3),

la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 78 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3), o

la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 79 (H-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3),

y

una región variable de cadena ligera que comprende cualquiera de:

la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 31 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),

la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 164 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 31 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),

la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 165 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 166 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3),

la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 165 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 167 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3).

En una realización, las CDR del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se definen según la numeración del grupo "Chemical Computing Group" (CCG).

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha indicado anteriormente, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha indicado anteriormente, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un Fab, un F(ab')<sub>2</sub>, un Fv y un scFv.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 108 y SEQ ID NO: 92, respectivamente

SEQ ID NO: 109 y SEQ ID NO: 93, respectivamente SEQ ID NO: 110 y SEQ ID NO: 94, respectivamente SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 95, respectivamente SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 96, respectivamente SEQ ID NO: 113 y SEQ ID NO: 97, respectivamente SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 98, respectivamente SEQ ID NO: 115 y SEQ ID NO: 99, respectivamente SEQ ID NO: 116 y SEQ ID NO: 100, respectivamente SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 101, respectivamente SEQ ID NO: 118 y SEQ ID NO: 102, respectivamente SEQ ID NO: 119 y SEQ ID NO: 103, respectivamente SEQ ID NO: 120 y SEQ ID NO: 104, respectivamente SEQ ID NO: 121 y SEQ ID NO: 105, respectivamente SEQ ID NO: 122 y SEQ ID NO: 106, respectivamente SEQ ID NO: 123 y SEQ ID NO: 107, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ NO: 131, SEQ NO: 133, SEQ NO: 135, SEQ NO: 137 o SEQ NO: 139 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ NO: 125, SEQ NO: 127 o SEQ NO: 129.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 125, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 133 y SEQ ID NO: 127, respectivamente.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 135 y SEQ ID NO: 127, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 137 y SEQ ID NO: 129, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 139 y SEQ ID NO: 129, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que presenta una identidad de por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % respecto a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 131 y SEQ ID NO: 125, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que presenta una identidad de por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % respecto a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 y SEQ ID NO: 127, respectivamente.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que presenta una identidad de por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % respecto a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 y SEQ ID NO: 127, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que presenta una identidad de por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % respecto a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 y SEQ ID NO: 129, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que presenta una identidad de por lo menos 90 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % respecto a las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 139 y SEQ ID NO: 129, respectivamente.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha indicado anteriormente, en el que el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA o IgE humana.

5 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 tal como se ha descrito anteriormente, en el que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de una IgG4 con una mutación Ser228Pro.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 tal como se ha descrito anteriormente, en el que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de una IgG1.

10 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 tal como se ha descrito anteriormente, en el que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de una Ig1 con mutaciones Leu234Ala y Leu235Ala.

15 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en kappa y lambda.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 143 y SEQ ID NO: 141, respectivamente.

20 La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 147 y SEQ ID NO: 145, respectivamente.

25 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 149 y SEQ ID NO: 145, respectivamente.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 153 y SEQ ID NO: 151, respectivamente.

30 La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 155 y SEQ ID NO: 151, respectivamente.

35 La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha cadena pesada consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 143 y la secuencia de aminoácidos de dicha cadena ligera consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO:141.

40 La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha cadena pesada consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 147 y la secuencia de aminoácidos de dicha cadena ligera consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO:145.

45 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha cadena pesada consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y la secuencia de aminoácidos de dicha cadena ligera consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO:145.

La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha cadena pesada consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 153 y la secuencia de aminoácidos de dicha cadena ligera consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO:151.

50 La exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha cadena pesada consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO: 155 y la secuencia de aminoácidos de dicha cadena ligera consiste en los aminoácidos de SEQ ID NO:151.

55 En una realización, un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización, un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente es un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo.

60 En una realización, un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente es un anticuerpo anti-PD-1 agonista o fragmento de unión a antígeno del mismo.

65 En una realización, un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente se une a PD-1 humano a alta afinidad, por ejemplo 20 nM o menos, por ejemplo 10 nM o menos, por ejemplo 5 nM o menos.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite para la unión a PD-1 con un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite para la unión a PD-1 con el anticuerpo A, el anticuerpo B, el anticuerpo C, el anticuerpo D o el anticuerpo E.

En una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente, para la utilización como un medicamento.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización en un método de tratamiento de un trastorno de la ruta de PD-1, que comprende la administración al paciente que lo necesita de una cantidad farmacéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente, para la utilización en el tratamiento de un trastorno de la ruta de PD-1. En una realización, la presente invención proporciona la utilización del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de la ruta de PD-1.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización en un método de modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L1 en un paciente humano, que comprende la administración al paciente humano de una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno tal como se ha descrito anteriormente, en una cantidad suficiente para activar la ruta de PD-1 en el paciente humano. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente, para la utilización en la modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L1 en un paciente humano. En una realización, la presente invención proporciona la utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno tal como se ha descrito anteriormente, en la preparación de un medicamento para modular la interacción entre PD-1 y PD-L1 en un paciente humano.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización en un método de atenuación de la expresión de expresión de PD-1 de la células T en un paciente humano, que comprende la administración al paciente humano de una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno tal como se ha descrito anteriormente, en una cantidad suficiente para modular negativamente la respuesta inmunitaria en el paciente humano. En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se ha descrito anteriormente, para la utilización en la atenuación de la actividad de células T expresantes de PD-1 en un paciente humano. En una realización, la presente invención proporciona la utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno tal como se ha descrito anteriormente, en la preparación de un medicamento para atenuar la actividad de células T expresantes de PD-1 en un paciente humano.

En una realización, en un método anteriormente indicado, en un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización anteriormente indicada, o en la utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, anteriormente, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en esclerosis sistémica (ES), lupus eritematoso sistémico, polimiositis, arteritis de células gigantes, soriasis, artritis soriásica, espondilitis anquilosante y enfermedad intestinal inflamatoria.

En una realización, en el método anteriormente indicado, en el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización indicada anteriormente, o en la utilización del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo indicado anteriormente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra mediante una vía parenteral, vía intravenosa o vía subcutánea de administración.

En una realización, la exposición proporciona un polinucleótido aislado codificante de amino de región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera tal como se ha descrito anteriormente.

En una realización, la exposición proporciona un polinucleótido aislado codificante de una cadena pesada y/o una cadena ligera tal como se ha descrito anteriormente.

En una realización, la exposición proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido tal como se ha descrito anteriormente.

En una realización, la exposición proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión tal como se ha descrito anteriormente. En una realización, la célula huésped es una célula de mamífero.

5 En una realización, la exposición proporciona un método de fabricación de un anticuerpo, que comprende las etapas siguientes:

- cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado codificante de una región variable de cadena pesada tal como se ha descrito anteriormente y un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de región variable de cadena ligera tal como se ha descrito anteriormente, bajo condiciones que permiten la formación de un anticuerpo, y
- recuperar dicho anticuerpo.

15 En una realización, la exposición proporciona un método de fabricación de un anticuerpo, que comprende las etapas siguientes:

- cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado codificante de una cadena pesada tal como se ha descrito anteriormente y un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de una cadena ligera tal como se ha descrito anteriormente, bajo condiciones que permiten la formación de un anticuerpo, y
- recuperar dicho anticuerpo.

25 En una realización, un método anteriormente indicado comprende, además, la etapa de purificar el anticuerpo. En una realización, un método anteriormente indicado comprende, además, la etapa de formular el anticuerpo en una composición farmacéutica.

La exposición proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno agonista de anti-PD-1 y un segundo sitio de unión a antígeno.

30 En una realización, el segundo sitio de unión a antígeno es un sitio de unión anti-CD48, un sitio de unión anti-CD-2, un sitio de unión anti-CD11 o un sitio de unión anti-CD3.

En una realización, el primer sitio de unión a antígeno agonista de anti-PD-1 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera tal como se ha descrito anteriormente.

35 En una realización, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

#### Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1: selectividad de anticuerpo anti-PD-1 para proteína PD-1 humana en un ensayo celular evaluada mediante citometría de flujo. IMF significa "intensidad media de fluorescencia<sup>2</sup>."

Figura 2: ensayo de unión competitiva de Fc-PD-1 humano de unión a Fc-D-L1 humano. Sensograma que ilustra la curva de unión de Fc-PD-1 25 nM a Fc-PD-L1 acoplado mediante aminas sobre la superficie del chip GLM (figura 2A). Sensogramas de anticuerpo C, MK-3475 y PD1AB-6-4P (500 nM) premezclado con Fc-PD-1 25 nM unido a Fc-PD-L1 mediante aminas sobre la superficie del chip GLM (figura 2B).

45 Figura 3: unión incrementada de PD-L1 a PD-1 en la presencia de anticuerpo agonista anti-PD-1. Ensayo de interacción PD-1 biotina: PD-L1 (figura 3A). Ensayo Delphia-Eu TRF de interacción PD-1 - PD-L1 en células CHO (figuras 3B y 3D). PD-1 en células CHO: ensayo de unión de PD-L1 biotina (figura 3C). En la figura 3D, los puntos de datos individuales solo se ilustran para el anticuerpo C; los puntos de datos individuales para los demás anticuerpos no se ilustran en la figura 3D debido a su estrecha proximidad unos a otros. PDC significa "porcentaje del control".

Figura 4: actividad funcional de las células T en la presencia de anticuerpo agonista anti-PD-1 o fragmentos F(ab')<sub>2</sub> derivados de anticuerpo agonista 723C2 parental (figura 4A) o anticuerpo agonista parental 820C3 (figura 4B). PDC significa "porcentaje del control".

55 Figura 5: inducción de la activación de PD-1 por un mAb contra CD48 tras el entrecruzamiento.

Figura 6: marcaje de células pan-T humanas con CellTrace-Violet, activación con mAb de CD3, y análisis de la proliferación celular mediante dilución de CellTrace.

Figura 7: constructos biespecíficos (figura 7A). Unión de cada brazo a PD-1 o CD48 demostrada mediante citometría de flujo sobre células Jurkat sobreexpresantes de PD-1 (figura 7B). Estimulación de las células T CD4<sup>+</sup> (PD1<sup>+</sup>) de memoria humanas con anti-CD3e unido a placa, en presencia de anticuerpos biespecíficos (AB) de PD-1/CD48 unidos a placa o anticuerpos de control (figura 7C). IMF significa "intensidad media de fluorescencia<sup>2</sup>."

#### Descripción detallada de la invención

65 La presente invención se refiere a la necesidad de tratamientos para trastornos inmunitarios e inflamatorios, en

particular trastornos inmunitarios e inflamatorios controlados por el sistema PD-1/PD-L1 y/o PD-L2. Para satisfacer dicha necesidad, la presente invención proporciona anticuerpos anti-PD-1 tal como se describe en las reivindicaciones, que no bloquean la interacción entre PD-1 y PD-L1. En un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos que potencian la interacción entre PD-1 y PD-L1. En un aspecto de la invención, los anticuerpos de la presente invención activan la ruta de señalización de PD-1. En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos agonistas anti-PD-1. El agonismo de PD-1 restaura el equilibrio inmunitario mediante inhibición de la expansión y función efectora de células T autorreactivas en enfermedades humanas, donde PD-1 se expresa pero podría no acoplarse, o acoplarse óptimamente, a sus ligandos. En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención resultan útiles en el tratamiento de trastornos inmunitarios e inflamatorios y rechazo del trasplante. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención resultan útiles para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades o trastornos que pueden aliviarse mediante la modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L1, en particular mediante la activación de la ruta de PD-1. En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención resultan útiles en el tratamiento y/o la prevención de la esclerosis sistémica (ES), el lupus eritematoso sistémico, la polimiositis, la arteritis de células gigantes, la soriasis, la artritis sorriásica, la espondilitis anquilosante o la enfermedad intestinal inflamatoria.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1, en particular un anticuerpo anti-PD-1 monoclonal, por ejemplo un anticuerpo anti-PD-1 monoclonal humanizado, que presenta una o más de las propiedades descritas posteriormente en la presente memoria. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención se une a PD-1 humano recombinante purificado con alta afinidad, por ejemplo 20 nM o menos, por ejemplo 10 nM o menos, por ejemplo 5 nM o menos. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención se une a PD-1 de *Cynomolgus* recombinante purificado con una afinidad de 50 nM o menos. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención se une selectivamente a PD-1, en particular a PD-1 humano. En un aspecto, un anticuerpo de la presente invención no se une a PD-1 de ratón, de rata o de conejo. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención no bloquea la unión de PD-L1 a PD-1. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención potencia la unión de PD-L1 a PD-1. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención atenúa la actividad de las células T en varios ensayos celulares funcionales tal como se muestra posteriormente en la presente memoria, por ejemplo mediante la inhibición de la producción de IFN $\gamma$ , la inhibición de la producción de IL-17A o la inhibición de la producción de IL-21. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención inhibe la acumulación de células humanas en un modelo de ratón y reduce los niveles de citoquinas inflamatorias humanas en el modelo de ratón. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención presenta propiedades farmacocinéticas favorables. En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención presenta propiedades farmacocinéticas favorables, por ejemplo rendimiento, calidad, estabilidad o solubilidad. Estas propiedades se muestran, por ejemplo, en los Ejemplos proporcionados posteriormente en la presente memoria.

La estructura generalizada de los anticuerpos o inmunoglobulinas es bien conocida por el experto en la materia, estas moléculas son glucoproteínas heterotetraméricas, normalmente de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro formando un heterodímero, y la molécula heterotrimérica está formada mediante un enlace disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de los heterodímeros. Aunque las cadenas ligera y pesada están unidas entre sí mediante un enlace disulfuro, el número de enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de la inmunoglobulina. Cada cadena pesada y cada cadena ligera también presenta puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada presenta en el extremo aminoterminal un dominio variable ( $V_H$ =cadena pesada variable), seguido de tres o cuatro dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y  $C_{H4}$ ), así como una región bisagra entre  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ . Cada cadena ligera presenta dos dominios, un dominio variable aminoterminal ( $V_L$ =cadena ligera variable) y un dominio constante carboxiterminal ( $C_L$ ). El dominio  $V_L$  está asociado no covalentemente al dominio  $V_H$ , mientras que el dominio  $C_L$  normalmente está unido covalentemente al dominio  $C_{H1}$  mediante un enlace disulfuro. Se cree que residuos aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadenas ligera y pesada (Chothia et al., 1985, *J. Mol. Biol.* 186:651-663, Vargas-Madrado E, Paz-García E. *J Mol Recognit.* 2003;16(3):113-120). Los dominios variables también se denominan en la presente memoria "regiones variables", y los dominios constantes, "regiones constantes".

Determinados dominios dentro de los dominios variables difieren ampliamente entre diferentes anticuerpos, es decir, son "hipervariables". Estos dominios hipervariables contienen residuos que participan directamente en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad, en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada, se concentra en tres segmentos conocidos como regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), o bucles hipervariables (HVL, por sus siglas en inglés). Las CDR se definen mediante la comparación de secuencias en Kabat et al., 1991, In: *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., mientras que las HVL se definen estructuralmente de acuerdo con la estructura tridimensional del dominio variable, tal como se describe en Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. En donde dichos métodos resultan en identificaciones ligeramente diferentes de una CDR, resulta preferente la definición estructural. Tal como definió Kabat, CDR-L1 está situada en aproximadamente los residuos 24 a 34; CDR-L2, en aproximadamente los residuos 50 a 56, y CDR-L3, en aproximadamente los residuos 89 a 97 en el dominio variable de cadena ligera; CDR-H1 está situada en aproximadamente los residuos 31 a 35; CDR-H2 en aproximadamente los residuos 50 a 65, y CDR-H3 en aproximadamente los residuos 95 a 102 en el dominio variable de cadena pesada. Una definición alternativa de las CDR es según la numeración del Chemical Computing Group (CCG) (Almagro et al., *Proteins* 2011; 79:3050-

3066 y Maier et al, *Proteins* 2014; 82:1599-1610). Las CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesada y ligera, por lo tanto, definen las propiedades únicas y funcionales específicas para un anticuerpo dado.

5 Las tres CDR en cada una de las cadenas pesada y ligera están separadas por regiones de marco (FR, por sus siglas en inglés), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Desde el extremo aminoterminal y el extremo carboxiterminal de los dominios variables de cadena pesada y ligera, las FR y CDR están dispuestas en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La configuración en gran medida de lámina  $\beta$  de las FR trae las CDR dentro de cada una de las cadenas a una estrecha proximidad unas respecto a otras, así como respecto a las CDR de la otra cadena. La conformación resultante contribuye al sitio de unión a antígeno (ver Kabat et al., 1991, NIH Publ. n.º 91-3242, vol. I, páginas 647 a 669), aunque no todos los residuos de CDR están necesariamente implicados directamente en la unión a antígeno.

15 Los residuos de FR y los dominios constantes de Ig generalmente no están directamente implicados en la unión a antígeno, aunque contribuyen a la unión de antígeno y/o median en la función efectora de los anticuerpos. Algunos residuos de FR se cree que presentan un efecto significativo sobre la unión de antígenos de por lo menos tres maneras: mediante unión no covalente directamente a un epítipo, mediante la interacción con uno o más residuos de CDR, y afectando a la interfaz entre las cadenas pesada y ligera. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de los antígenos, sino que median en diversas funciones efectoras de Ig, tales como la participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP, por sus siglas en inglés).

25 Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas de vertebrado se asignan a dos clases claramente diferentes: kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), basándose en la secuencia de aminoácidos del dominio constante. A título comparativo, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de mamífero se asignan a cinco clases principales de acuerdo con la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. IgG e IgA se dividen adicionalmente en subclases (isotipos), p. ej., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>, respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas son bien conocidas.

30 Las expresiones "anticuerpo", "anticuerpo anti-PD-1", "anticuerpo anti-PD-1 humanizado" y "anticuerpo anti-PD-1 humanizado variante" se utilizan en la presente memoria en el sentido más amplio y comprenden específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), anticuerpos con modificaciones menores, tales como truncados N- o C-terminales y fragmentos de anticuerpos, tales como dominios variables y otras partes de anticuerpos que muestran una actividad biológica deseada, p. ej., la unión de PD-1.

35 La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos; es decir, los anticuerpos individuales en esa población son idénticas excepto por mutaciones naturales o posibles alteraciones bien conocidas, tales como la eliminación de lisina C-terminal de la cadena pesada de anticuerpo o modificaciones post-traduccionales, tales como isomerización o desamidación de aminoácidos, oxidación de metionina o desamidación de asparagina o glutamina que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, que se dirigen contra un único determinante antigénico, un "epítipo". Por lo tanto, el modificador "monoclonal" es indicativo de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos dirigidos contra un epítipo idéntico y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante ningún método en particular. Debe interpretarse que los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante cualquier técnica o metodología conocida de la técnica, incluyendo, p. ej., el método del hibridoma (Kohler et al., 1975, *Nature* 256:495), o métodos de ADN recombinante conocidos de la técnica (ver, p. ej., patente US n.º 4.816.567), o métodos de aislamiento de anticuerpos monoclonales producidos recombinantemente utilizando bibliotecas fágicas de anticuerpos, utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., 1991, *Nature* 352: 624-628 y Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597.

40 Los anticuerpos quiméricos consisten en regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo de una especie (p. ej., un mamífero no humano, tal como un ratón) y las regiones constantes de cadena pesada y ligera del anticuerpo de otra especie (p. ej., ser humano) y puede obtenerse mediante la unión de secuencias de ADN codificantes de las regiones variables del anticuerpo de la primera especie (p. ej., el ratón) a las secuencias de ADN para las regiones constantes del anticuerpo de la segunda especie (p. ej., el ser humano) y la transformación de un huésped con un vector de expresión que contiene las secuencias unidas para permitir la producción de un anticuerpo quimérico. Alternativamente, el anticuerpo quimérico también podría ser uno en el que una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o ligera es idéntica, homóloga o una variante de la secuencia correspondiente en un anticuerpo monoclonal de otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia de consenso o de línea germinal. Entre los anticuerpos quiméricos pueden incluirse fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que el fragmento de anticuerpo muestre la actividad biológica deseada de su anticuerpo parental, por ejemplo la unión al mismo epítipo (ver, p. ej., la patente US n.º 4.816.567 y Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

45 Las expresiones "fragmento de anticuerpo", "fragmento de unión a antígeno", "fragmento de anticuerpo anti-PD-1",

"fragmento de anticuerpo anti-PD-1 humanizado", "fragmento de anticuerpo anti-PD-1 humanizado variante" se refieren a una parte de un anticuerpo anti-PD-1 de longitud completa, en el que se retiene una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo, la unión a un epítipo específico de PD-1. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, un diacuerpo, un anticuerpo lineal, un anticuerpo de cadena sencilla, un minicuerpo, un diacuerpo formado de fragmentos de anticuerpo y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos mediante, por ejemplo, el tratamiento de anticuerpos de longitud completa tratados con enzimas, tales como papaína o pepsina para generar fragmentos de anticuerpo útiles. La digestión con papaína se utiliza para producir dos fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno idénticos denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual. El fragmento Fab contiene, además, el dominio constante de la cadena ligera y el dominio C<sub>H1</sub> de la cadena pesada. El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que presenta dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de entrecruzar antígeno.

Otro ejemplo de fragmentos de anticuerpo según la invención son fragmentos Fab'. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la presencia de residuos adicionales, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo en el extremo C-terminal del dominio C<sub>H1</sub>. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> son pares de fragmentos Fab' unidos mediante residuos de cisteína en la región bisagra. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo también son conocidos.

Un fragmento "Fv" contiene un sitio completo de reconocimiento y unión de antígeno consiste en un dominio variable de dímero de una cadena pesada y una cadena ligera en asociación no covalente estrecha. En dicha configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan definiendo un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión a antígeno para el anticuerpo.

Entre los fragmentos de anticuerpo puede incluir, además, "Fv de cadena sencilla" o fragmentos "scFv". Un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" es una variante de Fv de cadena sencilla que comprende los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un anticuerpo, donde los dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. El Fv de cadena sencilla es capaz de reconocer y unirse a un antígeno. El polipéptido scFv puede contener opcionalmente, además, un conector polipeptídico situado entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> con el fin de facilitar la formación de una estructura tridimensional deseada para la unión a antígeno por el scFv (ver, p. ej., Pluckthun, 1994, In The Pharmacology of monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas 269 a 315).

Los fragmentos de anticuerpo pueden formar, además, segmentos Fd en tándem, que comprenden un par de segmentos Fc en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) para formar un par de regiones de unión a antígeno. Estos "anticuerpos lineales" pueden ser biespecíficos o monoespecíficos, tal como se describe en, por ejemplo, Zapata et al. 1995, Protein Eng. 8(10):1057-1062.

En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la invención es un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo. Un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo humanizado es un tipo específico de anticuerpo quimérico que incluye una variante de secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina, o fragmento de la misma, que es capaz de unión a un antígeno predeterminado y que comprende una o más FR que presenta sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o más CDR que presentan sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Dicha secuencia de aminoácidos no humana con frecuencia denominada secuencia "importada" normalmente se obtiene de un dominio de anticuerpo "importado", particularmente un dominio variable. En general, un anticuerpo humanizado incluye por lo menos las CDR o HVL de un anticuerpo no humano, insertado entre las FR de un dominio variable de cadena pesada o ligera humana. Los métodos de humanización de los anticuerpos se describen, por ejemplo, en Almagro et al., (2008) Frontiers in Bioscience 13, 1619-1633, o en el documento n.º WO12092374 A2.

La presente exposición describe anticuerpos anti-PD-1 humanizados específicos que contienen CDR derivadas del anticuerpo líder de ratón 723C2 insertado entre las FR de los dominios variables de cadena pesada y ligera de la secuencia de línea germinal humana. Además, se sustituyó una cisteína en la CDR3 de cadena pesada de 723C2 líder de ratón por una tirosina en los anticuerpos anti-PD-1 humanizados derivados de 723C2 líder de ratón ("DC" a "DY").

En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos un, y típicamente dos, dominios variables (tales como los contenidos, por ejemplo, en los fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc y Fv) en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de los CDR corresponde a los de una inmunoglobulina no humana, y específicamente en la presente memoria, las CDR son secuencias murinas de 723C2 líder de ratón y las FR son aquellas de una secuencia de consenso o de línea germinal de inmunoglobulina humana. En otro aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 humanizado incluye, además, por lo menos una parte de una región Fc de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Normalmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como también por lo menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo puede incluir, además, una o más de las regiones C<sub>H1</sub>, bisagra, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> y/o C<sub>H4</sub> de la cadena pesada, según resulte apropiado.

Un anticuerpo anti-PD-1 humanizado según la invención puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Por ejemplo, el dominio constante puede ser un dominio constante de fijación del complemento donde se desea que el anticuerpo humanizado muestre actividad citotóxica, y el isotipo normalmente es IgG<sub>1</sub>. Donde dicha actividad citotóxica no resulta deseable, el dominio constante puede ser de otro isotipo, p. ej., IgG<sub>2</sub>. Un anticuerpo anti-PD-1 humanizado alternativo puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo de inmunoglobulina, y seleccionar dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas se encuentra comprendido de los conocimientos habituales del experto en la materia.

En un aspecto, el dominio constante de un anticuerpo de la presente invención es IgG4Pro, que presenta una mutación de sustitución (Ser228Pro) que evita el intercambio de brazos de Fab. Dicha mutación Ser a Pro se encuentra en la región bisagra del esqueleto de IgG4 y normalmente se conoce como Ser228Pro, aunque su posición en la cadena pesada puede variar en unos cuantos aminoácidos, por ejemplo, dependiendo de la longitud de la región variable y/o la diferencia de la longitud de la bisagra entre IgG1 e IgG4. La mutación Ser a Pro en la región bisagra (Cys-Pro-Ser-Cys-Pro) se denomina en la presente memoria "Ser228Pro", independientemente de su posición en la cadena pesada. En otro aspecto, el dominio constante de un anticuerpo de la presente invención es IgG1KO, que presenta dos mutaciones en la región bisagra, Leu234Ala y Leu235Ala, para reducir la función efectora (ADCC).

Las FR y CDR, o HVL, de un anticuerpo anti-PD-1 humanizado no necesita corresponderse exactamente con las secuencias parentales. Por ejemplo, uno o más residuos en la CDR o HVL importada, o la secuencia de FR de consenso o de línea germinal puede alterarse (p. ej., mutagenizarse) mediante sustitución, inserción o deleción, de manera que el residuo aminoácido resultante ya no es idéntico al residuo original en la posición correspondiente en ninguna secuencia parental, aunque el anticuerpo sin embargo retiene la función de unión a PD-1. Dicha alteración normalmente no será extensa y será conservadora. Normalmente, por lo menos 75 % de los residuos del anticuerpo humanizado corresponden a los de la FR de consenso o de línea germinal parental y secuencias de CDR importadas, más frecuentemente por lo menos 90 % y lo más frecuentemente, más de 95 %, o más de 98 %, o más de 99 %.

Los residuos de inmunoglobulina que afectan a la interfaz entre las regiones variables de cadena pesada y ligera ("la interfaz V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>") son aquellos que afectan a la proximidad u orientación de las dos cadenas una respecto a la otra. Entre determinados residuos que podrían estar implicados en las interacciones entre cadenas se incluyen los residuos de V<sub>L</sub> 34, 36, 38, 44, 46, 87, 89, 91, 96 y 98 y los residuos de V<sub>H</sub> 35, 37, 39, 45, 47, 91, 93, 95, 100 y 103 (utilizando el sistema de numeración expuesto en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987)). La patente US n.º 6.407.213 comenta, además, que residuos tales como los residuos de V<sub>L</sub> 43 y 85, y los residuos de V<sub>H</sub> 43 y 60 también podrían estar implicados en dicha interacción. Aunque dichos residuos se indican para la IgG humana únicamente, son aplicables en diferentes especies. Los residuos de anticuerpo importantes que se espera razonablemente que estén implicados en interacciones entre cadenas se seleccionan para la sustitución en la secuencia de consenso.

La expresión "secuencia de consenso" y "anticuerpo de consenso" se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende el residuo aminoácido que ocurre más frecuentemente en cada ubicación en todas las inmunoglobulinas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad particular, p. ej., un dominio variable de inmunoglobulina humana. La secuencia de consenso puede estar basa en inmunoglobulinas de una especie particular o de muchas especies. Una secuencia, estructura o anticuerpo de "consenso" se entiende que comprende una secuencia humana de consenso tal como se describe en determinadas realizaciones, y se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos aminoácidos que ocurren más frecuentemente en cada localización en todas las inmunoglobulinas humanas de cualquier clase, isotipo o estructura de subunidad particular. De esta manera, la secuencia de consenso contiene una secuencia de aminoácidos que presenta en cada posición un aminoácido que está presente en una o más inmunoglobulinas conocidas, pero que podría no duplicar exactamente la secuencia de aminoácidos entera de cualquier inmunoglobulina individual. La secuencia de consenso de región variable no se obtiene a partir de cualquier anticuerpo o inmunoglobulina producida naturalmente (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), y variantes de la misma. Las FR de las secuencias de consenso de cadena pesada y ligera, y variantes de las mismas, proporcionan secuencias útiles para la preparación de anticuerpos anti-PD-1 humanizados. Ver, por ejemplo, la patente US n.º 6.037.454 y n.º 6.054.297.

Las secuencias de línea germinal humana se encuentran naturalmente en las poblaciones humanas. Una combinación de dichos genes de línea germinal genera diversidad de anticuerpos. Las secuencias de anticuerpo de línea germinal para la cadena ligera del anticuerpo proceden de los genes v y genes j conservados de kappa o lambda de línea germinal humana. De manera similar, las secuencias de cadena pesada proceden de genes v, d y j de línea germinal (LeFranc, M-P y LeFranc, G, "The Immunoglobulin Facts Book" Academic Press, 2001).

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un compuesto de su medio natural. Los componentes contaminantes del medio natural del anticuerpo son aquellos materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden ser enzimas, hormonas u otros solutos

proteicos o no proteicos. En un aspecto, el anticuerpo se purifica hasta un aislamiento por lo menos superior a 95 % en peso de anticuerpo, por ejemplo purificarse hasta por lo menos más de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

Un anticuerpo aislado incluye un anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes en las que se produce, debido a que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no se encontrará presente. Sin embargo, normalmente se preparará un anticuerpo aislado mediante por lo menos una etapa de purificación en la que se elimina el material celular recombinante.

La expresión "rendimiento de anticuerpo" tal como se utiliza según la invención se refiere a factores/propiedades que contribuyen al reconocimiento por parte del anticuerpo del antígeno o la eficacia de un anticuerpo *in vivo*. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo pueden afectar a las propiedades del anticuerpo, tales como el plegamiento, y pueden influir sobre factores físicos, tales como la tasa inicial de unión del anticuerpo a antígeno ( $k_a$ ), la constante de disociación del anticuerpo respecto del antígeno ( $k_d$ ), la constante de afinidad del anticuerpo para el antígeno ( $K_d$ ), la conformación del anticuerpo, la estabilidad de la proteína y la semivida del anticuerpo.

La expresión "anticuerpo agonista" tal como se utiliza según la invención se refiere a un anticuerpo, que tras la unión a PD-1, induce por lo menos una actividad biológica que resulta inducida por el ligando de PD-1, PD-L1. En un aspecto, la inducción es estadísticamente significativa en comparación con la inducción en ausencia del anticuerpo agonista. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo agonista cuando se induce por lo menos una actividad biológica por como mínimo aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % mayor que en ausencia del anticuerpo agonista, por ejemplo al medirla como en uno de los Ejemplos descritos posteriormente en la presente memoria. En algunas realizaciones, un "anticuerpo agonista" potencia la interacción entre PD-1 y PD-L1. Los ensayos de ejemplo para detectar las propiedades agonistas de PD-1 se describen en la presente memoria o son conocidas de la técnica.

El término "multiespecífico" se refiere a una proteína, tal como un anticuerpo, que se une específicamente a dos o más antígenos diferentes o dos o más epítopos diferentes dentro del mismo antígeno.

El término "biespecífico" se refiere a una proteína, tal como un anticuerpo, que se une específicamente a dos antígenos diferentes o dos epítopos diferentes dentro del mismo antígeno.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a PD-1 o al fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención es un anticuerpo biespecífico. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención es un anticuerpo multiespecífico. Los anticuerpos monoespecíficos que se unen específicamente a PD-1 proporcionados en la presente memoria pueden manipularse para formar anticuerpos biespecíficos.

Pueden generarse anticuerpos biespecíficos de longitud completa, por ejemplo utilizando el intercambio de brazos Fab (p. ej., intercambio de media molécula, el intercambio de una pareja cadena pesada-cadena ligera) entre dos anticuerpos bivalentes monoespecíficos mediante la introducción de sustituciones en la interfaz CH3 de cadena pesada en cada media molécula para favorecer la formación de heterodímero de dos medias moléculas de anticuerpo que presentan diferente especificidad *in vitro* en un medio sin células o utilizando la coexpresión. La reacción de intercambio de brazo Fab es el resultado de un enlace disulfuro.

También pueden generarse anticuerpos biespecíficos utilizando diseños tales como Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), botón-en-ochal (en inglés, Knob-in-Hole, Genentech), anticuerpos monoclonales entrecruzados (en inglés CrossMAbs, Roche) y la interacción de CH3 inducida electrostáticamente (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), el cuerpo con dominio de diseño de intercambio de cadenas (SEEDbody, por sus siglas en inglés) (EMD Serono), Biciclonic (Merus) y como productos DuoBody® (Genmab A/S).

Por ejemplo, puede generarse un anticuerpo biespecífico PD-1/CD2, PD-1/CD48, PD-1/CD11a o PD-1/CD3 utilizando los dominios VH/VL de los anticuerpos de PD-1 descritos en la presente memoria, o cualesquiera regiones VH/VL de anticuerpos agonistas anti-PD-1 publicados y cualesquiera regiones VH/VL de los anticuerpos publicados anti-CD2, anti-CD48, anti-CD11a o anti-CD3, respectivamente.

Un anticuerpo biespecífico puede comprender un primer dominio que se une a PD-1 y un segundo dominio que se une a CD2, CD48, CD11a o CD3.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o presentan un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos aminoácidos que son iguales, al compararlas y alinearlas para la máxima correspondencia. Con el fin de determinar el porcentaje de identidad, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácido nucleico para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Los residuos aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácido o de nucleótido correspondientes seguidamente se comparan. En el caso de que una posición en la primera secuencia esté ocupada por el mismo

residuo aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, el % de identidad =  $\frac{\text{n.º de posiciones idénticas}}{\text{n.º total de posiciones (p. ej., posiciones solapantes)}} \times 100$ ). En algunas realizaciones, las dos secuencias que se comparan son de la misma longitud después de la introducción de huecos dentro de las secuencias, según resulte apropiado (p. ej., excluyendo secuencia adicional que se extiende más allá de las secuencias que se comparan). Por ejemplo, en el caso de que se comparan secuencias de región variable, las secuencias líder y/o de dominio constante no son consideradas. Para las comparaciones de secuencia entre dos secuencias, una CDR "correspondiente" se refiere a una CDR en la misma localización en ambas secuencias (p. ej., CDR-H1 de cada secuencia).

La determinación del porcentaje de identidad o porcentaje de similitud entre dos secuencias puede llevarse a cabo utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo preferente de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado tal como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST pueden llevarse a cabo con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico codificante de una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas de BLAST pueden llevarse a cabo con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una proteína de interés. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede utilizar BLAST con huecos (en inglés "Gapped BLAST") tal como se describe en Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternativamente, puede utilizarse PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda iterada que detecta las relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitativo preferente de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software de alineación de secuencias del GCG. Al utilizar el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede utilizarse una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Son conocidos de la técnica algoritmos adicionales para el análisis de secuencias, y entre ellos se incluyen ADVANCE y ADAM, tal como se describe en Torellis y Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10:3-5, y FASTA descrito en Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que fija la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. En el caso de que ktup=2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se comparan mediante el análisis de pares de residuos alineados; en el caso de que ktup=1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup puede fijarse en 2 o 1 para las secuencias de proteína, o entre 1 y 6 para las secuencias de ADN. Por defecto si ktup no se especifica es 2 para proteínas y 6 para ADN. Alternativamente, puede llevarse a cabo la alineación de secuencias de proteínas utilizando el algoritmo CLUSTAL W, tal como lo describe Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266:383-402.

Una secuencia de ácido nucleico está "operablemente ligada" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una presencia de ácido nucleico o líder secretorio está operablemente ligado a un ácido nucleico codificante de un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está operablemente ligado a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión ribosómica está operablemente ligado a una secuencia codificante si está situado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN que se van a unir son contiguas, y en el caso de un líder secretorio, son contiguas y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores son opcionalmente contiguos. La unión puede llevarse a cabo mediante ligación en sitios de restricción convenientes. En caso de no existir tales sitios, pueden utilizarse adaptadores oligonucleótidos sintéticos o conectores.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y la totalidad de dichas denominaciones incluyen la progenie de las mismas. De esta manera, "transformantes" y "células transformantes" incluyen la célula objeto primaria y cultivos derivados de la misma con independencia del número de transferencias, que pueden estar transfectadas, por ejemplo, con uno o más vectores de expresión codificantes de una o más secuencias de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

El término "mamífero" para los fines del tratamiento según la invención se refieren a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domesticados y de granja, y animales de zoológico, de competición o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas y similares. Preferentemente el mamífero es un ser humano.

Un "trastorno", tal como se utiliza en la presente memoria, es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente memoria, en particular un anticuerpo anti-PD-1 humanizado descrito en la presente memoria. Lo anterior incluye trastornos o enfermedades crónicas o agudos, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "trastorno de la ruta de PD-1" o "enfermedad de la ruta de

PD-1" se refiere a una afección que puede aliviarse mediante modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L1, en particular mediante activación de la ruta de PD-1. Un "trastorno de la ruta de PD-1" o "enfermedad de la ruta de PD-1" incluye enfermedades asociadas a células T en las que se expresa PD-1. Un "trastorno de la ruta de PD-1" o "enfermedad de la ruta de PD-1" incluye, además, afecciones caracterizadas por células T autorreactivas activadas que expresan PD-1 y que son activadores de la inflamación crónica y la enfermedad autoinmunitaria, y en las que se desea la atenuación de la actividad de las células T expresantes de PD-1 y/o la modulación negativa de la respuesta inmunitaria. Entre los ejemplos de trastornos del a ruta de PD-1 se incluyen enfermedades o trastornos, tales como la esclerosis sistémica (ES), el lupus eritematoso sistémico, la polimiositis, la arteritis de células gigantes, la soriasis, la artritis sorriásica, la espondilitis anquilosante y la enfermedad intestinal inflamatoria.

La expresión "se une específicamente", o similar, se refiere a que un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. Se describen en la presente memoria métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente y entre ellos se incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia del plasmón superficial y similares. En una realización, la unión específica se caracteriza por una  $K_D$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M (100 nM) o inferior según el método de unión de afinidad descrito en el apartado de Ejemplos en la presente memoria. En otra realización, la unión específica se caracteriza por una  $K_D$  de aproximadamente  $5 \times 10^{-8}$  M (50 nM) o inferior según el método de unión de afinidad descrito en el apartado de Ejemplos en la presente memoria. En otra realización, la unión específica se caracteriza por una  $K_D$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M (10 nM) o inferior según el método de unión de afinidad descrito en el apartado de Ejemplos en la presente memoria. En otra realización, la unión específica se caracteriza por una  $K_D$  de aproximadamente  $5 \times 10^{-9}$  M (5 nM) o inferior según el método de unión de afinidad descrito en el apartado de Ejemplos en la presente memoria. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humano puede, sin embargo, presentar reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas PD-1 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede encontrarse sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o productos químicos.

La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco, por ejemplo un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, bajo la piel de un animal o paciente humano, preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subcutáneo, mediante la administración sostenida relativamente lenta a partir de un receptáculo de fármaco. Pellizcar o elevar la piel separándola del tejido subyacente puede crear el bolsillo.

La expresión "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco, por ejemplo un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, bajo la piel de un animal o paciente humano, preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subcutáneo, mediante la administración sostenida relativamente lenta a partir de un receptáculo de fármaco durante un periodo de tiempo que incluye, aunque sin limitación, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión puede llevarse a cabo mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración de fármaco bajo la piel del animal o paciente humano, en el que la bomba administra una cantidad predeterminada de fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos o un periodo de tiempo que comprende la duración del régimen de tratamiento.

La expresión "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, donde la administración de bolo de fármaco es inferior a aproximadamente 15 minutos; en otro aspecto, menos de 5 minutos, y en todavía otro aspecto, menos de 60 segundos. En todavía otro aspecto, la administración es dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subcutáneo, donde el bolsillo puede crearse mediante pellizcado o elevación de la piel separándola del tejido subyacente. Por ejemplo, "bolo subcutáneo" se refiere a la administración de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención a un paciente humano en menos de aproximadamente 15 minutos; en otro aspecto, menos de 5 minutos, y en todavía otro aspecto, menos de 60 segundos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza para referirse a una cantidad de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que alivia o mejora uno o más de los síntomas del trastorno bajo tratamiento. Al hacer lo anterior, es ésa la cantidad que presenta un resultado beneficioso para el paciente. La eficacia puede medirse de maneras convencionales, dependiendo de la afección que va a tratarse.

Los términos "tratamiento" y "terapia" y similares, tal como se utilizan en la presente memoria, pretenden incluir medidas terapéuticas, así como profilácticas o supresoras de una enfermedad o trastorno que conduce a cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, incluyendo, aunque sin limitación, el alivio o mitigación de uno o más síntomas, la regresión, ralentización o cese de la progresión de la enfermedad o trastorno. De esta manera, por ejemplo, el término "tratamiento" incluye la administración de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o trastorno, evitando o eliminando de esta manera uno o más signos de la enfermedad o trastorno. A título de otro ejemplo, el término incluye la administración de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la misma. Además, la administración de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo después de la aparición y después de desarrollarse síntomas clínicos, donde la administración afecta a parámetros clínicos de la enfermedad o trastorno, tales como el grado de lesión del tejido o la cantidad o extensión de la metástasis, conduzca o no el tratamiento al alivio de la enfermedad, comprende "tratamiento" o "terapia" tal como se utiliza en la presente memoria. Además, con la condición de que las

composiciones del a invención, solas o en combinación con otro agente terapéutico, alivien o mitiguen por lo menos un síntoma de un trastorno bajo tratamiento en comparación con ese síntoma en ausencia de utilización de la composición de anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, el resultado debería considerarse un tratamiento eficaz del trastorno subyacente con independencia de si todos los síntomas del trastorno son aliviados o no.

La expresión "impreso en el paquete" se utiliza para referirse a instrucciones habitualmente incluidas en paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, administración, contraindicaciones y/o advertencias referidas a la utilización de tales productos terapéuticos.

*Anticuerpos*

En la presente memoria se describen y dan a conocer anticuerpos anti-PD-1, en particular anticuerpos anti-PD-1 humanizados, así como composiciones y artículos de fabricación que comprenden anticuerpos anti-PD-1 de la presente exposición. Se describen, además, fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo anti-PD-1. Los anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden utilizarse en el tratamiento de una variedad de enfermedades o trastornos, en particular enfermedades o trastornos caracterizados por células T autorreactivas activadas que expresan PD-1 y son activadores de inflamación crónica y enfermedad autoinmunitaria. Cada uno del anticuerpo anti-PD-1 y fragmento de unión a antígeno del mismo incluye por lo menos una parte que reconoce específicamente un epítipo PD-1. En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-1 de la presente exposición y fragmentos de unión a antígeno del mismo son anticuerpos anti-PD-1 agonistas y fragmento de unión a antígeno de los mismos.

La generación de anticuerpos anti-PD-1 según la invención y su caracterización se describen en los Ejemplos. En una caracterización inicial, se seleccionó el anticuerpo líder anti-PD-1 quimérico 723C2 basándose en su rendimiento superior del anticuerpo, tal como se describe, por ejemplo, en los Ejemplos, posteriormente. Se generó una biblioteca de variantes mediante la introducción de las CDR del líder quimérico en las FR de los dominios variables de cadena pesada y ligera de consenso humanos y, adicionalmente, mediante ingeniería de las FR con diferentes alteraciones. Además, se sustituyó una cisteína en la CDR3 de cadena pesada de 723C2 líder de ratón por una tirosina en los anticuerpos anti-PD-1 humanizados derivados de 723C2 líder de ratón ("DC" a "DY"). El cambio de "DC" a "DY" no presentó ningún impacto sobre las propiedades farmacológicas de los anticuerpos. El procedimiento para la producción de anticuerpos humanizados se describe en los Ejemplos.

Las secuencias de aminoácidos de regiones variables de líderes de ratón representativos se muestran en las Tablas 1 y 2. Las regiones CDR de dichos líderes de ratón y las regiones CDR de variantes de ingeniería del anticuerpo líder 723C2 se muestran en las Tablas 3 y 4.

Tabla 1: anticuerpos líder de ratón anti-PD-1: secuencias VK

306E6VK	EIVMTQAAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSP QLLIYEMSNLASGVPDFRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCGQNLE FPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 92)
307A3VK	EIVMTQAAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSP QLLIYEMSNLASGVPDFRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCGQNLE FPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 93)
313C12VK	DIVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQKPGQSPKLLIY SVSNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQYSSYPFTF GAGTKLELK (SEQ ID NO: 94)
414A12VK	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSI TCHASQGINNNIGWLQKPGKSFKGLIY HKS NLEDGVPSRFSGSGSGADYSLTISSELEDFADYYCVQYAQFPYTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 95)
502H1VK	DIVMTQAAAFYNPVTLGTSASISCRSSKSLHRNGITYLYWYLQKPGQSP QLLIYQMSNLASGVPDFRFSSSGSGADFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLE LPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 96)

ES 2 994 127 T3

(continuación)

701C1VK	DIVMSQSPSSSLAVSVGEKVTMTCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQOKPGQS PKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCHQYY SSPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 97)
701E9VK	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQOKPDGTIKRLIY AASTLDSGVPKRFRSGSRGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYASYPLTF GAGTKLELK (SEQ ID NO: 98)
703D10VK	QIVLTQSPGIMSASPGEKVTITCSANSSVSFMHWFQOKPGTSPKIWIYS TSSLASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFG AGTKLELK (SEQ ID NO: 99)
708E4VK	DIVMTQSQKFLSTSVGDRVRVTCKASQNVVTVAWYQOKPGQSPKSLIY SASYRSGVDPDRFTGSGSGTYFTLTINNVQFEDLAEYFCQQYHSYPYTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 100)
709A6VK	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDIYGISFLHWYQOKPGQPPK HLIYRASNLDSGIPARFSGSGSRDTFTLTINPVETDDVATYYCQQSNKD PLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 101)
718C2VK	DIVMSQSPSSSLTVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKIYLAWFQOKPGQS PKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQYY NSPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 102)
723C2VK	EIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSASSISSDYLHWYQOKPGFPELLI YRTSNLASGVPARFSGSGSGTYSYSLTIGSMEAEDVATYYCQOQTSLPRA FGGTKLEIK (SEQ ID NO: 103)
803E6VK	DIVMTQSPSSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLHSGNQKNYMTWYQOKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDY SYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 104)
811G3VK	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQOKPDGTIKRLIY VASTLDSGVPKRFRSGSRGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYANYPYTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 105)
814E10VK	DIQMTQTTSSLSASLGDVRTISCSASQDIINYLNWYQOKPDGTVKLLIY STSSLHSGVSLRFRSGSGSGTDYSLTISNLEPEDVATYYCHQYSQLPYTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 106)
820C3VK	DIQMTQTTSSLSASLGDVRTISCSASQDIFNYLNWYQOKPDGTVKLLIY YTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFSLTISNLEPEDIATYYCQOYSNLPYTF GGGTKLEIK (SEQ ID NO: 107)

## ES 2 994 127 T3

Tabla 2: anticuerpos líder de ratón anti-PD-1: secuencias VH

306E6VH	EVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFTDYVNWVKQSHGKSLEWFGD IHPNSGDTTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRR YDYDGFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 108)
307A3VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYVNWVKQSHGKSLEWFGD IHPNNGGITYNQKFKGKASLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRR YDYDGFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 109)
313C12VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGMHWVRQTPEKGLEWIAI INSDSNTIYYADTVKGRFTISRDNARKTLYLQMTSLRSEDTAMYYCSPLV APDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 110)
414A12VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGHTFTSNWIHWKQRPQGQLEWIGE IDPSDSYTYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYSCACPG RNSNFAYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 111)
502H1VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVTVIRKPSGQGLEWL AHIFWDGDKRYNPSLKSRLTISKDSSSNQVFLMITGVGTADAATYYCARY YYFDYGYAIDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 112)
701C1VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVIHWKQKPGQGLEWIGY IDPSNDDTKYNEKFKGKATLTVSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAREA YYGGLYGMVWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 113)
701E9VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFIDYTIHWKQSPGQGLEWIGW IFPGSTNDTKYNDKFKGKATMTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARY RTDFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 114)
703D10VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYSFTSYWMHWVRQRPQGQLEWIGD IDPSNSYAYHSQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAD GTSHWYFDVWGAGTAVTVSS (SEQ ID NO: 115)
708E4VH	QIQQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYVLNWKQRPQGHGLEWIGW IYPGSSDTKHNNENFKGKATLTVDTYSSTAYMQLGSLTSEDSAVYFCARY NFFFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 116)
709A6VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWL THIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSRNQVFLVITVSDTADTATYFCARS SQGLYSSYDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 117)
718C2VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQKPGQGLEWIGY IDPDNDGTYNEKFKGKATLTVSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAREA YYGGLYGMVWGQGSSTVTVSS (SEQ ID NO: 118)

(continuación)

723C2VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMSWVRQTPEKRLEWVAY ISSGGGSSYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDVAVYYCARLP HYFAMDCWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 119)
803E6VH	EVKLVESEGGGLVQPSSMKLSCTASGFTFSDYYMAWVRQVPEKGLEWVAN INYDGFNTYYLDSLKSRFIISRDNKNILYLQMSLKSSEDVAVYYCARGG YWSLYFDYWGGTTLTVSS (SEQ ID NO: 120)
811G3VH	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYINWVKQRPQGGLWIGW IYPGGGHTKYNEKFKGEATLTVDTSSRTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARYS NYYFDFWGHGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 121)
814E10VH	QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTSYIQQWVKQRPQGGLWIGW IYPGDGTTNYNENFKGKTTLTADKSSSTVYMLLSSLTSEDSAVYFCARYG LVPFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 122)
820C3VH	QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGNTFNSNYIQQWVKQRPQGGLWIGW IYPGDGSTNYSEKFKGKTTLTADKSSSTAYMLVSSLTSEDSAVYFCARYG PVPFDYWGGTTLTVSS (SEQ ID NO: 123)

Las CDR de cadenas ligera y pesada de ratón de los diversos anticuerpos de ratón se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Las Tablas 3 y 4 también muestran tres CDR de cadena ligera y tres CDR de cadena pesada derivadas del anticuerpo de ratón 723C2 mediante el procedimiento de humanización.

Tabla 3: secuencias de CDR de cadena ligera

	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
306E6	RSSKSLHRNGITYLY (SEQ ID NO:1)	EMSNLAS (SEQ ID NO:2)	GQNLEFPLT (SEQ ID NO:3)
307A3	RSSKSLHRNGITYLY (SEQ ID NO:1)	EMSNLAS (SEQ ID NO:2)	GQNLEFPLT (SEQ ID NO:3)
313C12	KASQNVGTAVA (SEQ ID NO:4)	SVSNRYT (SEQ ID NO:5)	QQYSSYPFT (SEQ ID NO:6)
414A12	HASQGINNIG (SEQ ID NO:7)	HKSNLED (SEQ ID NO:8)	VQYAQFPYT (SEQ ID NO:9)
502H1	RSSKSLHRNGITYLY (SEQ ID NO:10)	QMSNLAS (SEQ ID NO:11)	AQNLELPLT (SEQ ID NO:12)
701C1	KSSQSLLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO:13)	WASTRES (SEQ ID NO:14)	HQYYSPLT (SEQ ID NO:15)
701E9	RASQEISGYLS (SEQ ID NO:16)	AASTLDS (SEQ ID NO:17)	LQYASYPLT (SEQ ID NO:18)
703D10	SANSSVSFMH (SEQ ID NO:19)	STSSLAS (SEQ ID NO:20)	QQRSSYPLT (SEQ ID NO:21)
708E4	KASQNVVTVYA (SEQ ID NO:22)	SASYRYS (SEQ ID NO:23)	QQYHSYPYT (SEQ ID NO:24)
709A6	RASESVDIYGISFLH (SEQ ID NO:25)	RASNLDL (SEQ ID NO:26)	QQSNKDPLT (SEQ ID NO:27)
718C2	KSSQSLLYSSNQKIYLA (SEQ ID NO:28)	WASTRES (SEQ ID NO:14)	QQYNSPLT (SEQ ID NO:29)
723C2	SASSISSDYLH (SEQ ID NO:30)	RTSNLAS (SEQ ID NO:31)	QQGTSLPRA (SEQ ID NO:32)
Hu_723C2-463-60	SASQSISSDYLH (SEQ ID NO:164)	RTSNLAS (SEQ ID NO:31)	QQGTSLPRA (SEQ ID NO:32)
Hu_723C2-462-07	QASQSISSDYLH (SEQ ID NO:165)	RTSNLET (SEQ ID NO:166)	QQGTSLPRA (SEQ ID NO:32)

(continuación)

	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
Hu_723C2-462-08	QASQSISSDYLN (SEQ ID NO:165)	RTSNLES (SEQ ID NO:167)	QQGTSLPRA (SEQ ID NO:32)
803E6	KSSQSLHSGNQKNYMT (SEQ ID NO:33)	WASTRES (SEQ ID NO:14)	QNDYSYPLT (SEQ ID NO:34)
811G3	RASQEISGYLS (SEQ ID NO:16)	VASTLDS (SEQ ID NO:35)	LQYANYPYT (SEQ ID NO:36)
814E10	SASQDIINYLN (SEQ ID NO:37)	STSSLHS (SEQ ID NO:38)	HQYSQLPYT (SEQ ID NO:39)
820C3	SASQDIFNYLN (SEQ ID NO:40)	YTSSLHS (SEQ ID NO:41)	QQYSNLPYT (SEQ ID NO:42)

Tabla 4: secuencias de CDR de cadena pesada

	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
306E6	GYTFTDYVVN (SEQ ID NO:43)	DIHPNSGDTTYNQKFKD (SEQ ID NO:44)	RRYDYDGFAY (SEQ ID NO:45)
307A3	GYTFTDYVVN (SEQ ID NO:43)	DIHPNNGGITYNQKFKG (SEQ ID NO:46)	RRYDYDGFAY (SEQ ID NO:45)
313C12	GFTFSDYGMH (SEQ ID NO:47)	YINSDSNTIYADTVKG (SEQ ID NO:48)	LVAPDY (SEQ ID NO:49)
414A12	GHTFTSNWIH (SEQ ID NO:50)	EIDPSDSYTYYNQKFKG (SEQ ID NO:51)	PGRNSNFAY (SEQ ID NO:52)
502H1	GFSLSTSGMGVT (SEQ ID NO:53)	HIFWDGDKRYNPSLKS (SEQ ID NO:54)	YYYFDYGYAIDY (SEQ ID NO:55)
701C1	GYTFTSYVIH (SEQ ID NO:56)	YIDPSNDDTKYNEKFKG (SEQ ID NO:57)	EAYYGGLYGMDY (SEQ ID NO:58)
701E9	GYTFIDYTIH (SEQ ID NO:59)	WIFPGSTNDTKYNDKFKG (SEQ ID NO:60)	YRTDFDY (SEQ ID NO:61)
703D10	GYSFTSYWMH (SEQ ID NO:62)	DIDPSNSYAYHSQKFKG (SEQ ID NO:63)	ADGTSHWYFDV (SEQ ID NO:64)
708E4	GYTFTDYVLN (SEQ ID NO:65)	WIYPGSSDTKHNFNFKG (SEQ ID NO:66)	YSNFFFDY (SEQ ID NO:67)
709A6	GFSLSTSGMGVS (SEQ ID NO:68)	HIYWDDDKRYNPSLKS (SEQ ID NO:69)	SSQGLYSSYDY (SEQ ID NO:70)
718C2	GYTFTSYVMH (SEQ ID NO:71)	YIDPDNDGTYNEKFKG (SEQ ID NO:72)	EAYYGGLYGMDY (SEQ ID NO:58)
723C2	GFTFSDYYMS (SEQ ID NO:73)	YISSGGGSSYPDSVKG (SEQ ID NO:74)	LPHYFAMDC (SEQ ID NO:75)
Hu_723C2-463-60	GFTFSDYYMS (SEQ ID NO:73)	YISSGGGSKYYPDLVKG (SEQ ID NO:76)	LPHYFAMDY (SEQ ID NO:77)
Hu_723C2-461-47	GFTFSDYYMS (SEQ ID NO:73)	YISSGGGSSYPDAVKG (SEQ ID NO:78)	LPHYFAMDY (SEQ ID NO:77)
Hu_723C2-461-40	GFTFSDYYMS (SEQ ID NO:73)	YISSGGGSSYPDLVKG (SEQ ID NO:79)	LPHYFAMDY (SEQ ID NO:77)
803E6	GFTFSDYYMA (SEQ ID NO:80)	NINYDGFNTYYLDSLKS (SEQ ID NO:81)	GGYWSLYFDY (SEQ ID NO:82)
811G3	GYTFTDYVIN (SEQ ID NO:83)	WIYPGGGHTKYNEKFKG (SEQ ID NO:84)	YSNYFFDF (SEQ ID NO:85)
814E10	GYTFTSYYIQ (SEQ ID NO:86)	WIYPGDGTTNYNENFKG (SEQ ID NO:87)	YGLVFPDY (SEQ ID NO:88)
820C3	GNTFNSNYIQ (SEQ ID NO:89)	WIYPGDGSTNYSEKFKG (SEQ ID NO:90)	YGPVFPDY (SEQ ID NO:91)

Las CDR enumeradas anteriormente, en las Tablas 3 y 4, se definen utilizando la numeración del Chemical Computing Group (CCG) (Almagro et al., Proteins 2011; 79:3050-3066 y Maier et al., Proteins 2014; 82:1599-1610).

Se proporciona un número representativo de regiones variables de cadena ligera y pesada humanizadas derivadas del anticuerpo 723C2 de ratón en las Tablas 5 y 6.

## ES 2 994 127 T3

Tabla 5: secuencias de 723C2-VK humanizadas

723C2VK-463-60	GATATCCAGATGACGCAGAGCCCCAAGCAGCCTGAGCGCGTCCGTGGG CGACCGCGTGACGATCACCTGTAGCGCGTCCCAGAGCATCAGCAGCG ACTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCAGGTAAAGCCCCCTAAACTG CTGATCTACCGGACCTCCAATCTGGCAAGCGGCGTGCCTAGCCGTTT CAGCGGTAGCGGCTCCGGTACCGACTTCACCTTTACTATCTCCAGCC TGCAGCCTGAAGACATCGCGACGTATTATTGTCAGCAGGGTACTAGC CTGCCTCGCGCCTTCGGCCAGGGGACCAAACCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:124)
	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQSSISSDYLHWYQQKPKAPKI LIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGTS LPRAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:125)
723C2VK-462-07	GATATCCAGATGACGCAGAGCCCCAAGCAGCCTGAGCGCGTCCGTGGG CGACCGCGTGACGATCACCTGTCAGGCGTCCCAGAGCATCAGCAGCG ACTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCAGGTAAAGCCCCCTAAACTG CTGATCTACCGGACCTCCAATCTGGAAACCGGCGTGCCTAGCCGTTT CAGCGGTAGCGGCTCCGGTACCGACTTCACCTTTACTATCTCCAGCC TGCAGCCTGAAGACATCGCGACGTATTATTGTCAGCAGGGTACTAGC CTGCCTCGCGCCTTCGGCCAGGGGACCAAACCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:126)
	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSSISSDYLHWYQQKPKAPKI LIYRTSNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGTS LPRAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:127)
723C2VK-462-08	GATATCCAGATGACGCAGAGCCCCAAGCAGCCTGAGCGCGTCCGTGGG CGACCGCGTGACGATCACCTGTCAGGCGTCCCAGAGCATCAGCAGCG ACTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCAGGTAAAGCCCCCTAAACTG CTGATCTACCGGACCTCCAATCTGGAAAGCGGCGTGCCTAGCCGTTT CAGCGGTAGCGGCTCCGGTACCGACTTCACCTTTACTATCTCCAGCC TGCAGCCTGAAGACATCGCGACGTATTATTGTCAGCAGGGTACTAGC CTGCCTCGCGCCTTCGGCCAGGGGACCAAACCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:128)
	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSSISSDYLHWYQQKPKAPKI LIYRTSNLESVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQGTS LPRAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:129)

ES 2 994 127 T3

Tabla 6: secuencia 723C2-VH humanizada

723C2VH-463-60	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGCCG CTCCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCAAGCGGTTTCACCTTTAGCGACT ACTATATGTCCTGGGTGCGTCAGGCGCCAGGTAAAGGTCTGGAATGG GTGTCATACATCAGCTCCGGGGCGGTAGCAAGTACTATCCGGACCT GGTCAAAGGGCGCTTTACTATCTCCCGGGATAATGCAAAAAATAGCC TGTACCTGCAGATGAGCAGCCTGCGGGCGGAAGATACCGCCGTGTAT TACTGTGCGCGTCTGCCGCATTATTTCCGCATGGATTACTGGGGCCA GGGGACCCTGGTGACCCTGAGCAGC (SEQ ID NO:130)
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWVRQAPGKGLEW VSYISSGGGSKYYPDLVKGRFTISRDNKNSLYLQMSLRAEDTAVY YCARLPHYFAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:131)
723C2VH-461-41	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGCCG CTCCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCAAGCGGTTTCACCTTTAGCGACT ACTATATGTCCTGGGTGCGTCAGGCGCCAGGTAAAGGTCTGGAATGG GTGGCATAACATCAGCTCCGGGGCGGTAGCAGTACTATCCGGACCT GGTCAAAGGGCGCTTTACTATCTCCCGGGATAATGCAAAAAATAGCC TGTACCTGCAGATGCAGAGCCTGCGGGCGGAAGATACCGCCGTGTAT TACTGTGCGCGTCTGCCGCATTATTTCCGCATGGATTACTGGGGCCA GGGGACCCTGGTGACCCTGAGCAGC (SEQ ID NO:132)
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWVRQAPGKGLEW VAYISSGGGSSYYPDLVKGRFTISRDNKNSLYLQMSLRAEDTAVY YCARLPHYFAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:133)
723C2VH-461-47	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGCCG CTCCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCAAGCGGTTTCACCTTTAGCGACT ACTATATGTCCTGGGTGCGTCAGGCGCCAGGTAAAGGTCTGGAATGG GTGGCATAACATCAGCTCCGGGGCGGTAGCAGTACTATCCGGACCG TGTCAAAGGGCGCTTTACTATCTCCCGGGATAATGCAAAAACAGAGCC TGTACCTGCAGATGCAGAGCCTGCGGGCGGAAGATACCGCCGTGTAT TACTGTGCGCGTCTGCCGCATTATTTCCGCATGGATTACTGGGGCCA GGGGACCCTGGTGACCCTGAGCAGC (SEQ ID NO:134)
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWVRQAPGKGLEW VAYISSGGGSSYYPDAVKGRFTISRDNKNSLYLQMSLRAEDTAVY YCARLPHYFAMDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:135)

(continuación)

723C2VH-461-44	<p>GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGCCG                  CTCCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCAAGCGGTTTACCTTTAGCGACT                  ACTATATGTCCTGGGTGCGTCAGGCGCCAGGTAAAGGTCTGGAATGG                  GTGGCCTACATCAGCTCCGGGGGCGGTAGCAGCTACTATCCGGACCT                  GGTGAAAGGGCGCTTTACTATCTCCCGGGATAATGCAAAACAGAGCC                  TGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCGGAAGATACCGCCGTGTAT                  TACTGTGCGCGTCTGCCGCATTATTTCCGCATGGATTACTGGGGCCA                  GGGGACCTGGTGACCCTGAGCAGC (SEQ ID NO:136)</p>
	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYSWVRQAPGKGLEW                  VAYISSGGGSSYPDLVKGRFTISRDNKQSLYLQMNLSRAEDTAVY                  YCARLPHYFAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:137)</p>
723C2VH-461-40	<p>GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCCTGGTGCAGCCAGGCCG                  CTCCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCAAGCGGTTTACCTTTAGCGACT                  ACTATATGTCCTGGGTGCGTCAGGCGCCAGGTAAAGGTCTGGAATGG                  GTGGCCTACATCAGCTCCGGGGGCGGTAGCAGCTACTATCCGGACCT                  GGTGAAAGGGCGCTTTACTATCTCCCGGGATAATGCAAAACAGAGCC                  TGTACCTGCAGATGCAGAGCCTGCGGGCGGAAGATACCGCCGTGTAT                  TACTGTGCGCGTCTGCCGCATTATTTCCGCATGGATTACTGGGGCCA                  GGGGACCTGGTGACCCTGAGCAGC (SEQ ID NO:138)</p>
	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYSWVRQAPGKGLEW                  VAYISSGGGSSYPDLVKGRFTISRDNKQSLYLQMSLRAEDTAVY                  YCARLPHYFAMDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:139)</p>

5 La combinación seleccionada de regiones variables de cadena ligera y pesada humanizadas derivadas del anticuerpo 723C2 de ratón resultó en los anticuerpos A, B, C, D y E:

- 10 Anticuerpo A: 723C2-IgG4Pro-463-60 con IgK-463-60 (región variable de cadena pesada 723C2VH-463-60 y región variable de cadena ligera 723C2VK-463-60);
- Anticuerpo B: 723C2-IgG4Pro-461-41 con IgK-462-07 (región variable de cadena pesada 723C2VH-461-41 y región variable de cadena ligera 723C2VK-462-07);
- 15 Anticuerpo C: 723C2-IgG4Pro-461-47 con IgK-462-07 (región variable de cadena pesada 723C2VH-461-47 y región variable de cadena ligera 723C2VK-462-07);
- Anticuerpo D: 723C2-IgG4Pro-461-44 con IgK-462-08 (región variable de cadena pesada 723C2VH-461-44 y región variable de cadena ligera 723C2VK-462-08).
- 20 Anticuerpo E: 723C2-IgG4Pro-461-40 con IgK-462-08 (región variable de cadena pesada 723C2VH-461-40 y región variable de cadena ligera 723C2VK-462-08).

Los anticuerpos A, B, C, D y E presentan las secuencias de cadena pesada y ligera mostrados en la Tabla 7.

20

ES 2 994 127 T3

Tabla 7: secuencias de ADN y aminoácidos de cadena pesada y ligera para los anticuerpos A, B, C, D y E.

<p>Anticuerpo A</p>	<p>IgK cadena ligera n.º 463-60</p>	<p>GATATCCAGATGACGCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCG  CGTCCGTGGGCGACCGCGTGACGATCACCTGTAGCGC  GTCCCAGAGCATCAGCAGCGACTATCTGCATTGGTAT  CAGCAGAAACCAGGTAAGCCCCCTAAACTGCTGATCT  ACCGGACCTCCAATCTGGCAAGCGCGTGCCTAGCCG  TTTCAGCGGTAGCGGCTCCGGTACCGACTTCACCTTT  ACTATCTCCAGCCTGCAGCCTGAAGACATCGCGACGT  ATTATTGTCAGCAGGGTACTAGCCTGCCTCGCGCCTT  CGGCCAGGGGACCAAACCTGGAATCAAACGTACTGTG  GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG  AGCAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT  GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG  TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC  AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC  CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA  GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA  CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTT  CAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:140)</p>
		<p><u>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQSISSDYLHWY</u>  <u>QOKPQKAPKLLIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTE</u>  <u>TISSLQPEDIATYYCQQGTSLPRAFQGGTKLEIKRTV</u>  AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKA  DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  (SEQ ID NO:141)</p>
	<p>IgG4Pro cadena pesada n.º  463-60</p>	<p>GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCCTGGTGC  AGCCAGGCGGCTCCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCAAG  CGGTTTCACCTTTAGCGACTACTATATGTCCTGGGTG  CGTCAGGCGCCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTGTCAT  ACATCAGCTCCGGGGGGCGGTAGCAAGTACTATCCGGA  CCTGGTAAAAGGGCGCTTTACTATCTCCCGGATAAT  GCAAAAAATAGCCTGTACCTGCAGATGAGCAGCCTGC  GGCGGAAGATACCGCCGTGTATTACTGTGCGCGTCT  GCCGCATTATTTGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGG  ACCCCTGGTGACCCTGAGCAGCGCCTCCACAAAGGGCC  CTTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTTGCTCCCGGTCCAC  CTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG  GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGT  CTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGC  TGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCC  GTCGTGACCGTGCCCTCCTTAGCCTGGGCACCAAGA</p>

(continuación)

		<p>CCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACAC          CAAGGTGGACAAGCGGGTGGGAATCTAAGTACGGCCCT          CCCTGCCCCCCTGCCCCTGCCCCTGAATTTCTGGGCG          GACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGA          CACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGC          GTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTCC          AGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAA          CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCC          ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCACCC          AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT          GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACC          ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGG          TGIACACCCTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAA          GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTC          TACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACG          GCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCCTGT          GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCTCGG          CTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACG          TCTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA          CCACTACACCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC          (SEQ ID NO:142)</p>
		<p><u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMSWV</u>  <u>RQAPGKGLEWVSYISGGGSKYYPDLVKGRFTISRDN</u>  <u>AKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARLPHYFAMDYWGQG</u>  <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</u>          DYFPEPVTISWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSS          VVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV<b>ESKYGP</b>  <b>PCP</b><b>PCP</b>EFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTC          VVVDVSQLDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS          TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT          ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF          YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR          LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSLG          (SEQ ID NO:143)</p>
<p>Anticuerpo B</p>	<p>IgK cadena ligera n.º 462-07</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCG          CCAGCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCCAGGC          CAGCCAGAGCATCAGCAGCGACTACCTGCACTGGTAC          CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCAAAGCTGCTGATCT          ACCGCACCAGCAACCTGGAGACCGGCGTGCCAAGCCG          CTTGAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTACCTTC          ACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACATCGCCACCT          ACTACTGCCAGCAGGGCACCGCCTGCCACGCGCCTT          CGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACTGTG          GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG          AGCAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT          GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG</p>

(continuación)

		<p>TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC          AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC          CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA          GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCA          CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT          CAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:144)</p>
		<p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSISSDYLHWY</u>  <u>QOKPGKAPKLLIYRTSNLETGVPSRFRSGSGSDFTF</u>  <u>TISSLQPEDIATYYCQQGTSLPRAFGQGTKLEIKRTV</u>          AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ          WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA          DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC          (SEQ ID NO:145)</p>
	<p>IgG4Pro cadena pesada n.º          461-41</p>	<p>GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGC          AGCCAGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCCAG          CGGCTTCACCTTCAGCGACTACTACATGAGCTGGGTG          CGCCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGTGGCCT          ACATCAGCAGCGGCGGCGGCAGCAGCTACTACCAGA          CCTGGTGAAGGGCCGCTTACCATCAGCCGCGACAAC          GCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGCAGAGCCTGC          GCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCCT          GCCACACTACTTCGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC          ACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACAAAGGGCC          CTTCCGTGTTCCCCCTGGCCCTTGCTCCCGGTCCAC          CTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG          GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGT          CTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCTGC          TGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCC          GTCGTGACCGTGCCCTCCTCTAGCCTGGGCACCAAGA          CCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACAC          CAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCTAAGTACGGCCCT          CCCTGCCCCCCTGCCCCTGCCCCTGAATTTCTGGGCG          GACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGA          CACCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGC          GTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTCC          AGTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAA          CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCC          ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCACACC          AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT          GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACC          ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGG          TGTACACCCTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAA          GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTC          TACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACG          GCCAGCCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGT          GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTGTACTCTCGG</p>

(continuacion)

		<p>CTGACCGTGGACAAGTCCCCTGGCAGGAAGGCAACG  TCTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA  CCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC  (SEQ ID NO:146)</p>
		<p><u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWV</u>  <u>RQAPGKGLEWVAYISSGGGSSYYPDLVKGRFTISRDN</u>  <u>AKNSLYLQMQLRAEDTAVYYCARLPHYFAMDYWGQG</u>  <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</u>  DYPFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV<b>ESKYGP</b>  <b>PCPEPC</b>PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT  ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR  LTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLG  (SEQ ID NO:147)</p>
Anticuerpo C	IgK cadena ligera n.º 462-07	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCG  CCAGCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCCAGGC  CAGCCAGAGCATCAGCAGCGACTACCTGCACTGGTAC  CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCT  ACCGCACCAAGCAACCTGGAGACCGGCGTGCCAAGCCG  CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTC  ACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACATCGCCACCT  ACTACTGCCAGCAGGGCACCAGCCTGCCACGCGCCTT  CGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCCTACTGTG  GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG  AGCAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT  GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG  TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC  AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC  CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA  GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA  CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT  CAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:144)</p>
		<p><u>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSISSDYLHWY</u>  <u>QOKPGKAPKLLIYRTSNLETGVPSRFSGSGSGTDFTE</u>  <u>TISSLQPEDIATYYCQQGTSLPRAFGQGTKLEIKRTV</u>  AAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKA  DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  (SEQ ID NO:145)</p>
	IgG4Pro cadena	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCTGGTGC  AGCCAGGTGGTAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAG  CGGCTTCACCTCAGCGACTACTACATGAGCTGGGTG</p>

(continuación)

<p>pesada n.º 461-47</p>	<p>CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCT  ACATCAGCAGCGGCGGGCAGCAGCTACTACCCAGA  CGCCGTGAAGGGCGCTTCACCATCAGCCGCGACAAC  GCCAAGCAGAGCCTGTACCTGCAGATGCAGAGCCTGC  GCGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCCT  GCCACACTACTTOGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC  ACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACAAAGGGCC  CTCCGTGTTCCCCCTGGCCCTTGCTCCCCTCCAC  CTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG  GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACT  CTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCTGC  TGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCC  GTCGTGACCGTGCCCTCCTCTAGCCTGGGCACCAAGA  CCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACAC  CAAGGTGGACAAGCGGGTGAATCTAAGTACGGCCCT  CCCTGCCCCCCTGCCCTGCCCTGAATTTCTGGGCG  GACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGA  CACCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGC  GTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTCC  AGTTAATGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAA  CGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCC  ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACC  AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT  GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACC  ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGG  TGTAACCCCTGCCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAA  GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTC  TACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACG  GCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCCTGT  GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCTCGG  CTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCCAACG  TCTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA  CCACTACACCAGAAAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC  (SEQ ID NO:148)</p>
	<p><u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWV</u>  <u>RQAPGKGLEWVAYISSGGSSYPDAVKGRFTISRDN</u>  <u>AKQSLYLQMQLRAEDTAVYYCARLPHYFAMDYWGQG</u>  <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</u>  <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS</u>  <u>VVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP</u>  <b>PCPE</b>CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  VVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT  ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR  LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSLG</p>

(continuación)

		(SEQ ID NO:149)
Anticuerpo D	IgK cadena ligera n.º 462-08	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCG CCAGCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCCAGGC CAGCCAGAGCATCAGCAGCGACTACCTGCACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCT ACCGCACCAGCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCAAGCCG CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTTC ACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACATCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGGGCACCAGCCTGCCACGCGCCTT CGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACTGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:150)
		<u>DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQASQSISSDYLHWY</u> <u>QQKPGKAPKLLIYRTSNLESGVPSRFSGSGSGTDFTE</u> <u>TISSLQPEDIATYYCQQGTSLPRAFGQGTKLEIKRTV</u> AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:151)
	IgG4Pro cadena pesada n.º 461-44	GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGTGGTGGCCTGGTGC AGCCAGGCGGCTCCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCAAG CGGTTTACCTTTAGCGACTACTATATGTCCTGGGTG CGTCAGGCGCCAGGTAAGGTCTGGAATGGGTGGCCT ACATCAGCTCCGGGGCGGTAGCAGCTACTATCCGGA CCTGGTCAAAGGGCGCTTTACTATCTCCCGGGATAAT GCAAAACAGAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGC GGCGGAAGATACCGCCGTGTATTACTGTGCGCGTCT GCCGATTAATTCGCCATGGATTACTGGGGCCAGGGG ACCTTGGTGACCGTGAGCAGCGCCTCCACAAAGGGCC CTTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCAC CTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGT CTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCTGC TGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCTCC GTCGTGACCGTGCCCTCCTCTAGCCTGGGCACCAAGA CCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACAC CAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAATCTAAGTACGGCCCT CCCTGCCCCCCTGCCCTGCCCTGAATTTCTGGGGC

(continuación)

		<p>GACCCTCCCGTGTTCCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGA  CACCCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGC  GTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTCC  AGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGACAAA  CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCC  ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACC  AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT  GTCCAACAAGGGCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACC  ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGG  TGTACACCCTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAA  GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTC  TACCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACG  GCCAGCCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGT  GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACTCTCGG  CTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACG  TCTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA  CCACTACACCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC  (SEQ ID NO:152)</p>
		<p><u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWV</u>  <u>ROAPGKGLEWVAYISSGGSSYYPDLVKGRFTISRDN</u>  <u>AKQSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLPHYFAMDYWGQG</u>  <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</u>  DYPFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VIVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV<b>ESKYGP</b>  <b>PCP</b><b>PCP</b>APPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC  VVVDVSOEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN  TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT  ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR  LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSLG  (SEQ ID NO:153)</p>
<p>Anticuerpo E</p>	<p>IgK cadena ligera n.º 462-08</p>	<p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCG  CCAGCGTGGGCGACCGCGTGACCATCACCTGCCAGGC  CAGCCAGAGCATCAGCAGCGACTACCTGCACTGGTAC  CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCAAAGCTGCTGATCT  ACCGCACCAGCAACCTGGAGAGCGCGTGCCAAGCCG  CTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTACCTTC  ACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACATCGCCACCT  ACTACTGCCAGCAGGGCACCAGCCTGCCACGCGCCTT  CGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACTGTG  GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG  AGCAATTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT  GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG  TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC  AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC  CTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA</p>
		<p>GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA  CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT  CAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:150)</p>

(continuación)

		<p><u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSISSDYLHWY</u>  <u>QOKPGKAPKLLIYRTSNLESGVPSRFSGSGSGTDFTF</u>  <u>TISSLQPEDIATYYCQQGTSLPRAFGQGTKLEIKRTV</u>  AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ  WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA  DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  (SEQ ID NO:151)</p>
	<p>IgG4Pro cadena pesada n.º  461-40</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGGCCTGGTGC  AGCCAGGTGGTAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAG  CGGCTTCACCTTCAGCGACTACTACATGAGCTGGGTG  CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCT  ACATCAGCAGCGGCGGGCAGCAGCTACTACCCAGA  CCTGGTGAAGGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGACAAC  GCCAAGCAGAGCCTGTACCTGCAGATGCAGAGCCTGC  CGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCCT  GCCACACTACTTCGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC  ACCCTGGTGACCCTGAGCAGCGCCTCCACAAAGGGCC  CTTCCGTGTTCCTCCCTGGCCCTTGCTCCCGGTCCAC  CTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG  GACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACT  CTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGC  TGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCTC  GTCGTGACCGTGCCCTCCTTAGCCTGGGCACCAAGA  CCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACAC  CAAGGTGCACAAGCGGGTGGAACTAAGTACGGCCCT  CCCTGCCCCCTGCCCCTGCCCTGAATTTCTGGGCG  GACCTCCGTGTTCCTGTTCCTCCCAAGCCCAAGGA  CACCTGATGATCTCCCGACCCCGAAGTGACCTGC  GTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGTCC  AGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAA  CGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCC  ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAACC  AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT  GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACC  ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCGCGAGCCCGAGG  TGTACACCCTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAA  GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTC  TACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACG  GCCAGCCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCTGT  GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCTCGG  CTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACG  TCTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA</p>

(continuación)

		CCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC (SEQ ID NO:154)
		<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWV</u> <u>RQAPGKGLEWVAYISSGGSSSYYPDLVKGRFTISRDN</u> <u>AKQSLYLQMQLRAEDTAVYYCARLPHYFAMDYWGQG</u> <u>TLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS</u> <u>VVTVESSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP</u> <b>PCP</b> <b>PCP</b> APAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:155)

5 Las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada de los anticuerpos A, B, C, D y E están subrayadas en la Tabla 7. La región bisagra en las regiones constantes de cadena pesada se muestra en negrita con la mutación Ser228Pro en una caja.

10 El anticuerpo líder de ratón 723C2 también se convirtió en los formatos IgG1 WT humano, IgG1 KO e IgG4Pro. IgG4Pro presenta una mutación en la región bisagra, Ser228Pro, que impide el intercambio de los brazos Fab. IgG1 KO presenta dos mutaciones en la región bisagra: Leu234Ala y Leu235Ala, que reducen la función efectora (ADCC).

El anticuerpo quimérico 723C2 en formatos IgG1WT, IgG1KO e IgG4Pro humanos se muestra en la Tabla 8.

15 Tabla 8: secuencias de ADN y de aminoácidos de cadena pesada y ligera del anticuerpo quimérico 723C2 en IgG1WT, IgG1KO e IgG4Pro humanas

Anticuerpo 723C2 quimérico en IgG1WT (723-IgG1WT)	IgK cadena ligera	GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTACCACAATGGCCG CCTCTCCAGGCGAGAAGATCACCATCACATGTAGCGC CAGCAGCAGCATCAGCAGCGACTACCTGCACTGGTAT CAGCAGAAGCCTGGCTTCAGCCCCGAGCTGCTGATCT ACAGAAACAAGCAATCTGGCCAGCGGCGTGCCAGCCAG ATTTTCTGGTTCCTGGCAGCGGCACCAGCTACAGCCTG ACAATCGGATCCATGGAAGCCGAGGACGTGGCCACCT ATTACTGTCAGCAGGGCACAAGCCTGCCTAGAGCCTT TGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACTGTG GCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAATTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCTCACAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO:156)
---	-------------------	--

(continuación)

		<p>EIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSASSSISSDYLHWY          QQKPGFPELLIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSL          TIGSMEAEDVATYYCQQGTSLPRAFGGGTKLEIKRTV          AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ          WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA          DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC          (SEQ ID NO:157)</p>
	<p>IgG1WT cadena          pesada</p>	<p>GAAGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGAGGACTTGTTT          AACCTGGCGGCAGCCTGAAACTGTCTTGTGCCGCCAG          CGGCTTCACCTTCAGCGACTACTACATGAGCTGGGTC          CGACAGACCCCTGAGAAGAGACTGGAATGGGTGCGCT          ACATCAGCTCTGGCGGCGGAAGCAGCTACTACCCTGA          TAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAAC          ACCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGTCCAGCCTGA          AGTCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGACT          GCCTCACTACTTCGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGC          ACCAGCGTGACCGTTTCTTCTGCCTCCACCAAGGGCC          CATCGGTCTTCCCGCTAGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC          CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG          GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGA          CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC          TGTCTACAGTCTTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC          GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA</p>
		<p>CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC          CAAGGTGGACAAGCGCGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC          AAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC          TACTAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC          ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG          GTCACATGCGTGCTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC          CTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGA          GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG          TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG          TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA          GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC          GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG          AACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGCGAGGA          GATGACCAAGAACCAGGTAAGTTTGACCTGCCTGGTC          AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG          AGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCAC          GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC          TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC          AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC          TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG          TCTCCGGGT (SEQ ID NO:158)</p>

(continuación)

		<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMSWV  RQTPEKRLEWVAYISSGGSSYYPDSVKGRFTISRDN  TKNTLYLQMSLSEDTAVYYCARLPHYFAMDYWGQG  TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD  KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL  SPG (SEQ ID NO:159)</p>
<p>anticuerpo 723C2 quimérico  en IgG1KO(723 -IgG1KO)</p>	<p>IgK cadena ligera</p>	<p>(SEQ ID NO: 156)</p>
		<p>(SEQ ID NO: 157)</p>
	<p>IgG1KO cadena  pesada</p>	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTTGTTT  AACCTGGCGGCAGCCTGAAACTGTCTTGTGCCGCCAG  CGGCTTCACCTTCAGCGACTACTACATGAGCTGGGTC  CGACAGACCCCTGAGAAGAGACTGGAATGGGTGCGCT  ACATCAGCTCTGGCGGCGGAAGCAGCTACTACCCTGA  TAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAAC</p>
		<p>ACCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGTCCAGCCTGA  AGTCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGACT  GCCTCACTACTTCGCCATGGATTGTTGGGGCCAGGGC  ACATCTGTGACCGTTAGTTCTGCCTCCACCAAGGGCC  CATCGGTCTTCCCGCTAGCACCCCTCCTCCAAGGCAC  CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG  GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGA  ACTCAGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGC  TGTCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA  CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACAC  CAAGGTGGACAAGCGCGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC  AAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAG  CCGCTGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAA  ACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG  GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC  CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA  GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCCCTACCG  TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA  GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC  GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG  AACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGCGAGGA  GATGACCAAGAACCAGGTAAGTTGACCTGCCTGGTC  AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG  AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACAAGACCAC  GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC  TATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC  AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC  TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG  TCTCCGGGT (SEQ ID NO:160)</p>

(continuación)

		<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSDYYMSWV  RQTPEKRLEWVAYISSGGGSSYYPDSVKGRFTISRDN  TKNTLYLQMSLKSEDTAVYYCARLPHYFAMDCWQG  TSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK  DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCD  KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE  VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV  KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL  YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL  SPG (SEQ ID NO:161)</p>
<p>anticuerpo 723C2 quimérico  en IgG4Pro (723-IgG4Pro)</p>	<p>IgK cadena ligera</p>	<p>(SEQ ID NO: 156)</p>
		<p>(SEQ ID NO: 157)</p>
	<p>IgG4Pro cadena  pesada</p>	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTTGTTTC  AACCTGGCGGCAGCCTGAAACTGTCTTGTGCCGCCAG  CGGCTTCACCTTCAGCGACTACTACATGAGCTGGGTC  CGACAGACCCCTGAGAAGAGACTGGAATGGGTGCCT  ACATCAGCTCTGGCGGCGGAAGCAGCTACTACCCTGA  TAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAAC  ACCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGTCCAGCCTGA  AGTCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGACT  GCCTCACTACTTCGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGC  ACCAGCGTGACCGTTTCTTCTGCCCTCCACAAAGGGCC  CTTCCGTGTTCCCCCTGGCCCTTGCTCCCGGTCCAC  CTCCGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAG  GACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACT  CTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACACTTCCCTGC  TGTGCTGCAGTCCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCC  GTCGTGACCGTGCCCTCCTCTAGCCTGGGCACCAAGA  CCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACAC  CAAGGTGGACAAGCGGGTGGAACTAAGTACGGCCCT  CCCTGCCCCCCTGCCCTGCCCTGAATTTCTGGGCG  GACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGA  CACCCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGC  GTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAAGATCCCGAGGTCC  AGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAA  CGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCC  ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACC  AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGT  GTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACC  ATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGG  TGTACACCCTGCCTCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAA  GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTC  TACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACG  GCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGT  GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACTCTCGG  CTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACG  TCTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA  CCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCTGGGC  (SEQ ID NO:162)</p>

(continuación)

		EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTSDYYMSWV RQTPEKRLEWVAYIISGGGSSYYPDSVKGRFTISRDN
		TKNTLYLQMSLLKSEDTAVYYCARLPHYFAMDYWGQG TSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP FCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSDDEPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSL SLG (SEQ ID NO:163)

Los aminoácidos correspondientes al cambio de DC a DY en H-CDR3 están subrayados en las secuencias de aminoácidos en la Tabla 8.

*Humanización y variantes de secuencia de aminoácidos*

Pueden modificarse anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de anticuerpos variantes adicionales basándose en el conjunto de CDR ilustrados en las Tablas 3 y 4. Debe entenderse que en los anticuerpos anti-PD-1 variantes y fragmentos de anticuerpo, la secuencia de aminoácidos de las CDR se mantienen sin cambios, aunque las regiones circundantes, p. ej., las regiones FR, pueden ser modificadas. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-PD-1 pueden prepararse mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ADN del anticuerpo anti-PD-1, o mediante síntesis peptídica. Entre dichas variantes se incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-PD-1 de los ejemplos en la presente memoria. Se realiza cualquier combinación de deleciones, inserciones y sustituciones para llegar al constructo final, con la condición de que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-PD-1 humanizado o variante, tal como modificar el número o posición de los sitios de glucosilación.

La presente exposición incluye anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo de los mismos que presentan una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable son por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 92,5 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en las Tablas 1, 2, 5 y 6.

La exposición incluye anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de anticuerpo de los mismos que presentan una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable son por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 92,5 %, por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 131, 133, 135, 137 o 139, y las SEQ ID NO: 125, 127 o 129, respectivamente.

La presente exposición incluye anticuerpos anti-PD-1 que presentan una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable son por lo menos 95 %, por lo menos 98 % o por lo menos 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en las Tablas 7 y 8.

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo implica la alteración del patrón de glucosilación original del anticuerpo. El término "alterar" en el presente contexto significa deleccionar una o más fracciones carbohidrato presentes en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no estaban presentes previamente en el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede comprender una sustitución de aminoácido en la posición 297 de la cadena pesada de IgG1 humana para anular la glucosilación mediada por el complejo enzimático de oligosaciltransferasa mediante sustitución de la asparagina 297 (p. ej., N297A, N297G).

En algunos aspectos, la presente exposición incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos anti-PD1 descritos en la presente memoria. Se preparan moléculas de ácidos nucleicos codificantes de variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-PD-1 mediante una

variedad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de las variantes naturales de secuencia de aminoácidos) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante del anticuerpo anti-PD-1. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico según la exposición comprenden, además, moléculas de ácido nucleico que se hibridan bajo condiciones restrictivas a moléculas de ácido nucleico tal como se dan a conocer en la presente memoria, en donde la expresión "condiciones restrictivas" puede incluir, p. ej., la hibridación en un tampón que comprende formamida al 50 %, 5xSSC y SDS al 1 % a 42 °C, o la hibridación en un tampón que comprende 5xSSC y SDS al 1 % a 65 °C, ambos con un lavado de 0,2xSSC y SDS al 0,1 % a 65 °C. Las condiciones de hibridación restrictivas de ejemplo pueden incluir también una hibridación en un tampón de formamida al 40 %, NaCl 1 M y SDS al 1 % a 37 °C y un lavado en 1xSSC a 45 °C.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es un fragmento de anticuerpo. Existen técnicas que se han desarrollado para la producción de fragmentos de anticuerpos. Pueden derivarse fragmentos mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, p. ej., Morimoto et al., 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117, y Brennan et al., 1985, *Science* 229:81). Alternativamente, los fragmentos pueden producirse directamente en las células huésped recombinantes. Por ejemplo, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (ver, p. ej., Carter et al., 1992, *Bio/Technology* 10:163-167). Mediante otro enfoque, pueden aislarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> directamente a partir de un cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán evidentes para el experto en la materia.

En un aspecto, los anticuerpos anti-PD1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden incluir modificaciones, tales como glucosilación o desamidación.

En determinadas realizaciones, puede resultar deseable utilizar un fragmento de anticuerpo anti-PD-1, en lugar de un anticuerpo intacto. Puede resultar deseable modificar el fragmento de anticuerpo con el fin de incrementar su semivida en suero. Lo anterior puede conseguirse, por ejemplo, mediante incorporación de un epítipo de unión a receptor de rescate en el fragmento de anticuerpo. En un método, la región apropiada del fragmento de anticuerpo puede alterarse (p. ej., mutarse), o el epítipo puede incorporarse en una etiqueta peptídica que seguidamente se fusiona con el fragmento de anticuerpo en cualquiera de los extremos o en el centro, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o peptídica. Ver, p. ej., el documento n.º WO 96/32478. Por ejemplo, también pueden fusionarse fragmentos de anticuerpos con albúmina sérica humana para incrementar la semivida en suero, en el caso de que la utilización de un andamiaje de IgG1 de longitud completa resulte indeseable. Dichas proteínas de fusión del fragmento de anticuerpo con albúmina sérica humana puede resultar ventajosa en situaciones en las que dos fragmentos de anticuerpo diferentes necesitan fusionarse para incrementar la avidéz, o para generar una proteína de unión biespecífica con semivida en suero extendida (ver, p. ej., el documento n.º WO05077042 A2).

En otras realizaciones, la presente exposición incluye modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-PD-1. Entre las modificaciones covalentes se incluyen la modificación de residuos cisteinilo, residuos histidilo, residuos lisinilo y aminotermiales, residuos arginilo, residuos tirosilo, grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo), residuos glutaminilo y asparaginilo, o residuos serilo o treonilo. Cualquier tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al anticuerpo. Dichas modificaciones pueden prepararse mediante síntesis química o mediante corte enzimático o químico del anticuerpo, en caso aplicable. Pueden introducirse otros tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula haciendo reaccionar residuos aminoácidos diana del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos aminotermiales o carboxitermiales.

La eliminación de cualesquiera fracciones carbohidrato presentes en el anticuerpo puede conseguirse química o enzimáticamente. La desglucosilación química es descrita por Hakimuddin et al., 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 y por Edge et al., 1981, *Anal. Biochem.*, 118:131. Puede conseguirse el corte enzimático de las fracciones de carbohidrato sobre los anticuerpos mediante la utilización de una variedad de endoglucosidasas y exoglucosidasas tal como describen Thotakura et al., 1987, *Meth. Enzymol* 138:350.

Otro tipo de modificación covalente útil comprende la unión del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteicos, p. ej., polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en una o más de las patentes US n.º 4.640.835, n.º 4.496.689, n.º 4.301.144, n.º 4.670.417, n.º 4.791.192 y n.º 4.179.337.

#### *Unión de epítopos*

En otro aspecto, la exposición se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce un "epítipo de antígeno PD-1" y "epítipo de PD-1" específicos.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "epítipo de antígeno PD-1" y "epítipo de PD-1" se refieren a una molécula (p. ej., un péptido), o un fragmento de una molécula, capaz de unirse a un anticuerpo anti-PD-

1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. Dichas expresiones incluyen, además, por ejemplo, un determinante antigénico de PD-1 reconocido por cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la presente exposición.

5 Los epítopos de antígeno PD-1 pueden incluirse en proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos o similares. Los epítopos son más habitualmente proteínas, oligopéptidos cortos, miméticos de oligopéptidos (es decir, compuestos orgánicos que mimetizan las propiedades de unión a anticuerpo del antígeno PD-1), o combinaciones de los mismos.

10 En un aspecto, un anticuerpo anti-PD-1 de la presente exposición o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítipo de PD-1 de una manera que mimetiza la unión del ligando fisiológico que resulta en agonismo mediado por el anticuerpo.

15 La presente exposición proporciona, además, un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite para la unión a PD-1 con un anticuerpo anti-PD-1 según la presente exposición. La presente exposición proporciona un anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite para la unión a PD-1 con cualquiera de anticuerpo A, anticuerpo B, anticuerpo C, anticuerpo D o anticuerpo E descritos en la presente memoria. Los ensayos competitivos pueden llevarse a cabo tal como se describe en, por ejemplo, PLoS One. 2014; 9(3): e92451 utilizando un biosensor, o PLoS One 2020 Mar 5;15(3):e0229206, o mediante un método dado a conocer en la presente memoria.

20 *Usos terapéuticos*

En una realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos resultan útiles para tratar o prevenir trastornos de la ruta de PD-1.

25 En otra realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos resultan útiles como un medicamento.

30 De acuerdo con lo anterior, en una realización, la presente invención proporciona una composición para la utilización en un método de modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L1 en un paciente humano, que comprende la administración a dicho paciente humano una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición en una cantidad suficiente para activar la ruta de PD-1 en dicho paciente humano. En una realización, la presente exposición proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente invención para la utilización en la modulación de la interacción entre PD-1 y PD-L1 en un paciente humano. En una realización, la presente exposición proporciona la utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno según la presente invención en la preparación de un medicamento para modular la interacción entre PD-1 y PD-L1 en un paciente humano.

35 En una realización, la presente exposición proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización en un método de atenuación de la expresión de expresión de PD-1 de la células T en un paciente humano, que comprende la administración al paciente humano de una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición, en una cantidad suficiente para modular negativamente la respuesta inmunitaria en el paciente humano. En una realización, la presente exposición proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición para la utilización en la atenuación de la actividad de células T expresantes de PD-1 en un paciente humano. La presente exposición proporciona la utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición en la preparación de un medicamento para atenuar la actividad de células T expresantes de PD-1 en un paciente humano.

40 En una realización, una enfermedad o trastorno de la ruta de PD-1 es la esclerosis sistémica (ES), el lupus eritematoso sistémico, la polimiositis, la arteritis de células gigantes, la soriasis, la artritis soriásica, la espondilitis anquilosante y la enfermedad intestinal inflamatoria. La presente exposición proporciona un método de tratamiento o prevención de la esclerosis sistémica (ES), lupus eritematoso sistémico, polimiositis, arteritis de células gigantes, soriasis, artritis soriásica, espondilitis anquilosante o enfermedad intestinal inflamatoria en un paciente humano, que comprende la administración a dicho paciente humano de una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición. En una realización, la presente exposición proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición para la utilización en el tratamiento o la prevención de la esclerosis sistémica (ES), el lupus eritematoso sistémico, la polimiositis, la arteritis de células gigantes, la soriasis, la artritis soriásica, la espondilitis anquilosante y la enfermedad intestinal inflamatoria en un paciente humano. En una realización, la presente exposición proporciona la utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o prevención de la esclerosis sistémica (ES), el lupus eritematoso sistémico, la polimiositis, la arteritis de células gigantes, la soriasis, la artritis soriásica, la espondilitis anquilosante y la enfermedad intestinal inflamatoria en un paciente humano.

45 En una realización, una enfermedad o trastorno de la ruta de PD-1 es crónico o agudo, tal como la enfermedad inflamatoria crónica o la enfermedad inflamatoria aguda. En una realización, una enfermedad o trastorno de la ruta de

PD-1 es artritis, artritis reumatoide, asma, EPOC, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, soriasis, artritis soriásica, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, ictus, diabetes de tipo I, enfermedad de Lyme, meningoencefalitis, uveítis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, lupus (tal como el lupus eritematoso sistémico), síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía de IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Meniere, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, escleroderma, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo del trasplante, enfermedad cardíaca, incluyendo enfermedades isquémicas, tales como el infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipocloridia, infertilidad relacionada con la falta de tolerancia fetomaterna, síndrome de Sjögren, vitíligo, miastenia grave o esclerosis sistémica.

De acuerdo con lo anterior, en una realización, la presente exposición proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización en un método de tratamiento o prevención de una de las enfermedades o trastornos anteriormente indicados en un paciente humano, que comprende la administración a dicho paciente humano de una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición. En una realización, la presente exposición proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición para la utilización en el tratamiento o la prevención de una de las enfermedades o trastornos anteriormente indicados en un paciente humano. En una realización, la presente exposición proporciona la utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la presente exposición para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o prevención de una de las enfermedades o trastornos anteriormente indicados en un paciente humano.

En un aspecto, el anticuerpo de PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización o en una utilización tal como se ha descrito anteriormente o en un método tal como se ha descrito anteriormente es un anticuerpo anti-PD-1 agonista o fragmento de unión a antígeno del mismo.

#### *Usos no terapéuticos*

Los anticuerpos descritos en la presente memoria resultan útiles como agentes de purificación por afinidad. En este procedimiento, los anticuerpos son inmovilizados sobre una fase sólida, tal como una resina con proteína A, utilizando métodos bien conocidos de la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene la proteína PD-1 (o fragmento de la misma) que va a purificarse, y después, se lava el soporte con un solvente adecuado que eliminará sustancialmente la totalidad del material en la muestra excepto la proteína PD-1, que se encuentra unida al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, se lava el soporte con otro solvente adecuado que liberará la proteína PD-1 respecto del anticuerpo.

Los anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de los mismos tal como se dan a conocer en la presente memoria también resultan útiles en ensayos diagnósticos para detectar y/o cuantificar la proteína PD-1, por ejemplo, la detección de la expresión de PD-1 en células, tejidos o suero específicos.

Resultará ventajoso en algunas realizaciones, por ejemplo, para fines diagnósticos, marcar el anticuerpo con una fracción detectable. Se encuentran disponibles numerosos marcajes detectables, incluyendo isótopos radioactivos, marcajes fluorescentes, marcajes de sustrato enzimático, puntos cuánticos y similares. El marcaje puede conjugarse indirectamente con el anticuerpo utilizando diversas técnicas conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcajes mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a la avidina y, de esta manera, el marcaje puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Alternativamente, para conseguir la conjugación indirecta del marcaje con el anticuerpo, el anticuerpo puede conjugarse con un hapteno de tamaño reducido (tal como digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcaje mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo antihapteno (p.ej., anticuerpo antidigoxina). De esta manera, puede conseguirse la conjugación indirecta del marcaje con el anticuerpo.

Entre los marcajes isótopos radioactivos de ejemplo se incluyen  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ . El anticuerpo puede marcarse con el isótopo radioactivo utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, volúmenes 1 y 2, 1991, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. Puede medirse la radioactividad, por ejemplo, mediante recuento de centelleo.

Entre los marcajes fluorescentes de ejemplo se incluyen marcajes derivados de quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y rojo de Texas se encuentran disponibles, o, p. ej., cualquiera de los marcajes fluorescentes siguientes: dialquilaminocumarina, isotiocianato de rodamina, Alexa 350, Alexa 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, AMCA, aminoacridina, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, carboxirrodamina 6G, carboxi-X-rodamina (ROX), azul *Cascade Blue*, amarillo *Cascade*

5 *Yellow*, cumarina 343, colorantes de cianina (Cy3, Cy5, Cy3.5, Cy5.5), dansilo, dapoxilo, dialquilaminocumarina, DM-NERF, eosina, eritrosina, fluoresceína, FA, hidroxycumarina, IRDyes (IRD40, IRD 700, IRD 800), JOE, lisamina rodamina B, azul *Marina blue*, metoxicumarina, naftofluoresceína, verdes *Oregon Green 488*, *Oregon Green 500* y *Oregon Green 514*, azul *Pacific Blue*, PyMPO, 5-carboxi-4',5,-dicloro-2',7'-dimetoxi fluoresceína, 5-carboxi-2',4',5,,7'-tetrafluoresceína, 5-carboxifluoresceína, 6-carboxirrodamina, 6-carboxitetrametil amino, azul *Cascade Blue*, Cy2, Cy3, Cy5, 6-FAM, cloruro de dansilo, fluoresceína, HEX, 6-JOE, NBD (7-nitrobenc-2-oxa-1,3-diazol), verdes *Oregon Green 488*, *Oregon Green 500* y *Oregon Green 514*, azul *Pacific Blue*, ácido ftálico, ácido tereftálico, ácido isoftálico, violeta de cresilo rápido, violeta azul de cresilo, azul de cresilo brillante, ácido para-aminobenzoico, eritrosina, ftalocianinas, azometinas, cianinas, xantinas, succinilfluoresceínas, criptatos de metales de tierras raras, tris-bipiridina de europio diamina, criptato o quelato de europio, diamina, dicianinas, pigmento azul de La Jolla, alofocianina, alocianina B, ficocianina C, ficocianina R, tiamina, ficoeritrocianina, ficoeritrina R, REG, verde rodamina, isotiocianato de rodamina, rojo rodamina, TAMRA, TET, TRIT (isotiol de tetrametil-rodamina), tetrametil-rodamina, o rojo de Texas. Los marcajes fluorescentes pueden conjugarse con el anticuerpos mediante técnicas conocidas, tales como las dadas a conocer en Current Protocols in Immunology, *supra*, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse utilizando un fluorímetro.

15 Existen diversos marcajes de enzima-sustrato bien caracterizados que se conocen de la técnica (ver, p. ej., la patente US n.º 4.275.149 para una revisión). El enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, la alteración puede ser un cambio de color en un sustrato que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, el enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio de fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y entonces puede emitir luz que puede medirse, utilizando un quimioluminómetro, por ejemplo, o donar energía a un aceptor fluorescente.

25 Entre los ejemplos de marcajes enzimáticos se incluyen luciferasas, tales como la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana (patente US n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (tales como glucosa oxidasas, galactosa oxidasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasas), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en, por ejemplo, O'Sullivan et al., 1981, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (J. Langone y H. Van Vunakis, eds.), Academic press, N.Y., 73: 147-166.

35 Entre los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato se incluyen, por ejemplo: La peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en donde la hidrogeno peroxidasa oxida un precursor del pigmento, tal como ortofenilén-diamina (OPD) o hidrocioruro de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), fosfatasa alcalina (AP, por sus siglas en inglés) con para-nitrofenilfosfato como sustrato cromogénico, y  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico, tal como p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.

40 Numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato se encuentran disponibles para el experto en la materia. Para una revisión general de ellos, ver la patente US n.º 4.275.149 y n.º 4.318.980.

45 En otra realización, se utiliza un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo de la exposición no marcado y se detecta con un anticuerpo marcaje que se une al anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo. Por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos anti-Fc humanos o anti-Fab humanos para detectar el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento no marcados. La utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmentos del mismo, no marcados, según la expresión puede resultar ventajoso para conseguir una mejor penetración en los tejidos, ya que el marcaje fluorescente incrementará el peso molecular y/o incrementará la hidrofobicidad del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con el que está fusionado, reduciendo de esta manera la penetración en los tejidos.

50 Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden utilizarse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Ver, p. ej., Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, páginas 147 a 158 (CRC Press, Inc. 1987). *Kits diagnósticos*

55 Puede utilizarse un anticuerpo anti-PD-1 humanizado de la exposición en un kit diagnóstico, es decir, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el ensayo diagnóstico. En donde el anticuerpo está marcado con un enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por el enzima, tales como un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable. Además, pueden incluirse otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis), y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse en forma de polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que presenta la concentración apropiada.

60 *Kits diagnósticos*

Puede utilizarse un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento del mismo en un kit diagnóstico, es decir, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el ensayo diagnóstico. En donde el anticuerpo está marcado con un enzima, el kit puede incluir sustratos y cofactores requeridos por el enzima, tales como un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable. Además, pueden incluirse otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis), y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Los reactivos pueden proporcionarse en forma de polvos secos, habitualmente liofilizados, incluyendo excipientes que al disolverse proporcionarán una solución de reactivo que presenta la concentración apropiada.

#### *Composiciones y administración de las mismas*

Puede administrarse al sujeto una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo según la exposición, que presente o que esté en riesgo de presentar enfermedades o trastornos de la ruta de PD-1 descritos en la presente memoria. La exposición proporciona, además, la utilización de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en la preparación de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno de la ruta de PD-1. El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier paciente mamífero al que puede administrarse un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo, p. ej., seres humanos y determinados mamíferos no humanos, tales como primates y perros. Entre los sujetos específicamente destinados al tratamiento utilizando los métodos descritos en la presente memoria se incluyen seres humanos. El anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la exposición puede administrarse solo o en combinación con otras composiciones.

En un aspecto, la presente exposición proporciona, además, composiciones farmacéuticas que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente exposición.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden utilizarse para administrar el anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Entre los métodos de introducción se incluyen, aunque sin limitación, vías intravítrea, gotas oculares, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede administrarse, por ejemplo, mediante infusión, bolo o inyección, y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Pueden prepararse formulaciones para tales inyecciones en, por ejemplo, jeringas precargadas.

Puede administrarse un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles.

En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa o subcutánea en seres humanos. Normalmente, las composiciones para la administración mediante inyección son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. En caso necesario, el farmacéutico puede incluir, además, un agente solubilizador y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan entre sí en la forma de dosis unitaria, por ejemplo, en forma de unos polvos liofilizados secos o concentrado libre de agua en un envase herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. En donde el farmacéutico se va a administrar mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril o solución salina. En donde el farmacéutico se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que puedan mezclarse los ingredientes previamente a la administración.

Además, la composición farmacéutica puede proporcionarse en forma de un kit farmacéutico que comprende: (a) un envase que contiene un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en forma liofilizada, y (b) un segundo envase que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable (p. ej., agua estéril) para inyección. El diluyente farmacéuticamente aceptable puede utilizarse para la reconstitución o dilución del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo liofilizado. Opcionalmente asociados a dicho envase o envases puede haber un impreso en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, utilización o comercialización de farmacéuticos o productos biológicos, con un impreso que refleje la aprobación por la agencia de fabricación, utilización o comercialización para la administración en el ser humano.

La cantidad del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que resulta eficaz en el tratamiento o la prevención de las enfermedades o trastornos de la ruta de PD-1 puede determinarse mediante técnicas clínicas estándares. Además, pueden utilizarse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa a emplear en la formación también dependerá de la vía de administración, y el estadio del trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis

eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o modelos animales.

Por ejemplo, la toxicidad y eficacia terapéutica del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede determinarse en cultivos celulares o animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos estándares para determinar la ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población). Resulta preferente un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo que muestra un índice terapéutico elevado.

Los datos obtenidos en ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden utilizarse en la formulación de un abanico de dosis para la utilización en seres humanos. La dosis del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo normalmente se encuentra comprendido dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la ED<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de dicho intervalo, dependiendo de la forma de administración empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo utilizado en el método, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones plasmáticas circulantes que incluya la IC<sub>50</sub> (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que alcance una inhibición semimáxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información puede utilizarse para determinar más exactamente las dosis útiles en seres humanos. Pueden medirse los niveles en el plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento, ELISA y similares.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 se administra a intervalos regulares.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente exposición pueden formularse en dosis que incluyen, por ejemplo, entre 1 mg/ml y 250 mg/ml, por ejemplo entre 20 mg/ml y 200 mg/ml.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender, además, un agente terapéutico, conjugado o no conjugado con el agente de unión.

Dicha administración de terapia de combinación puede presentar un efecto aditivo o sinérgico sobre los parámetros de la enfermedad (p. ej., la gravedad de un síntoma, el número de síntomas o la frecuencia de recaída).

Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinatorial, en una realización específica, se administra un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo concurrentemente con un agente terapéutico. En otra realización específica, el agente terapéutico se administra antes o después de la administración del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

#### *Polinucleótidos, vectores, células huésped y métodos recombinantes*

La presente exposición se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia codificante de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, vectores y células huéspedes que comprenden los polinucleótidos, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Los polinucleótidos aislados pueden codificar cualquier forma deseada del anticuerpo anti-PD-1 que incluye, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

El polinucleótido o polinucleótidos que comprenden una secuencia codificante de un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento o cadena del mismo pueden fusionarse con una o más secuencia reguladora o de control, tal como es conocido de la técnica, y puede estar contenido en vectores de expresión o células huésped adecuados, tal como es conocido de la técnica. Cada una de las moléculas de polinucleótido codificante de los dominios variables de cadena pesada o ligera puede fusionarse independientemente con una secuencia polinucleótida codificante de un dominio constante, tal como un dominio constante humano, que permite la producción de anticuerpos intactos. Alternativamente, pueden fusionarse entre sí polinucleótidos, o partes de los mismos, proporcionando un molde para la producción de un anticuerpo de cadena sencilla.

Para la producción recombinante, se inserta un polinucleótido codificante del anticuerpo en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Se encuentran disponibles muchos vectores adecuados para expresar el anticuerpo recombinante. Entre los componentes vector generalmente se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción.

Los anticuerpos anti-PD-1 también pueden producirse en forma de polipéptidos de fusión, en los que el anticuerpo se fusiona con un polipéptido heterólogo, tal como una secuencia de señal u otro polipéptido que presenta un sitio de corte específico en el extremo aminoterminal de la proteína madura o polipéptido. La secuencia de señal heteróloga seleccionada típicamente es una que es reconocida y procesada (es decir, cortada por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procarióticas que no reconocen y procesar la secuencia de señal de

anticuerpo anti-PD-1, la secuencia de señal puede sustituirse por una secuencia de señal procariótica. La secuencia de señal puede ser, por ejemplo, fosfatasa alcalina, penicilinas, lipoproteína, líderes de enterotoxina II termoestables, y similares. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal nativa puede sustituirse, por ejemplo, por una secuencia líder obtenida del factor alfa invertasa de levadura (incluyendo líderes factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), fosfatasa ácida, glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento n.º WO90/13646. En células de mamífero, pueden utilizarse secuencias de señal de mamífero, así como líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex. El ADN para dicha región precursora es ligada en el mismo marco de lectura al ADN codificante del anticuerpo anti-PD-1 humanizado.

Los vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación, dicha secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 resulta adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen plasmídico 2-u. resulta adecuado para levaduras y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV y BPV) para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el componente origen de replicación no resulta necesario para los vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 puede utilizarse normalmente solo debido a que contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen que codifica un marcador seleccionable para facilitar la identificación de la expresión. Los genes marcadores seleccionables típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina neomicina, metotrexato o tetraciclina, o alternativamente, son deficiencias auxotróficas complementarias, o en otras alternativas suministran nutrientes específicos que no están presentes en medios complejos, p. ej., el gen codificante de la D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Dichas células que se han transformado con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y, de esta manera, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina. Los marcadores seleccionables comunes para las células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para incorporar un ácido nucleico codificante de un anticuerpo anti-PD-1 humanizado, tal como DHFR (dihidrofolato reductasa), timidina quinasa, metalotioneína-I y II (tal como genes de metalotioneína de primate), adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa y similares. Las células transformadas con el gen de selección DHFR en primer lugar se identifican mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Una célula huésped apropiada al utilizar DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) deficiente en actividad de DHFR (p. ej., DG44).

Alternativamente, pueden seleccionarse células huésped (particularmente huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógeno) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN codificantes de anticuerpo anti-PD-1, proteína DHFR de tipo salvaje y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH, por sus siglas en inglés), mediante crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucosídico, p. ej., kanamicina, neomicina o G418. Ver, p. ej., la patente US n.º 4.965.199.

Donde se lleva a cabo la producción recombinante en una célula de levadura como célula huésped, puede utilizarse el gen TRP1 presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., 1979, Nature 282: 39) como un marcador seleccionable. El gen TRP1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977, Genetics 85:12). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un medio efectivo para detectar la transformación por el crecimiento en la ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2p*, tales como ATCC n.º 20.622 y n.º 38.626 se complementan mediante plásmidos conocidos portadores del gen *LEU2*.

Además, los vectores derivados del plásmido circular de 1,6  $\mu$ m pKD1 pueden utilizarse para la transformación de las levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se ha informado de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina recombinante de vaca para *K. lactis* (Van den Berg, 1990, Bio/Technology 8:135). También se han dado a conocer vectores de expresión multicopia para la secreción de albúmina de suero humano recombinante maduro por cepas industriales de *Kluyveromyces* (Fleer et al., 1991, Bio/Technology 9:968-975).

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operablemente ligado a la molécula de ácido nucleico codificante de un anticuerpo anti-PD-1 o cadena polipeptídica del mismo. Entre los promotores adecuados para la utilización con huéspedes procarióticos se incluyen los promotores *phoA*,  $\beta$ -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. También resultan adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para la utilización en sistemas bacterianos también contienen una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operablemente ligada al ADN codificante del anticuerpo anti-PD-1 humanizado.

Se conocen muchas secuencias de promotor eucariótico. Prácticamente la totalidad de los genes eucarióticos presentan una región rica en AT situada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio en que se inicia la transcripción. Otra secuencia presenta 70 a 80 bases cadena arriba del sitio de transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucarióticos se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. La totalidad de dichas secuencias se insertan convenientemente en vectores de expresión eucarióticos.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para la utilización con huéspedes levaduras se incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otros enzimas glucolíticos, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Los promotores inducibles presentan la ventaja adicional de que la transcripción está controlada por las condiciones de crecimiento. Entre ellos se incluyen las regiones promotoras de levadura para la alcohol deshidrogenasa 2, la isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas derivados que están asociados al metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras en el documento n.º EP 73.657 o en Baghban et al., *Molecular Biotechnology* (2019) 61:365-384. Los intensificadores de levadura también se utilizan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo anti-PD-1 a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, el virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 del simio (SV40, por sus siglas en inglés), de promotores de mamífero heterólogos, p. ej., el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina, o de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas celulares huésped.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente en forma de un fragmento de restricción del SV40 que también contiene el origen de replicación vírico del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente en forma de un fragmento de restricción HindIII E. Se da a conocer un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero utilizando el virus del papiloma bovino como vector en la patente US n.º 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la patente US n.º 4.601.978. Ver también Reyes et al., 1982, *Nature* 297:598-601, que da a conocer la expresión de ADNc de p-interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus del herpes simplex. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous puede utilizarse como el promotor.

Otro elemento útil que puede utilizarse en un vector de expresión recombinante es una secuencia de intensificador, que se utiliza para incrementar la transcripción de un ADN codificante de un anticuerpo anti-PD-1 por eucarióticas superiores. Actualmente se conocen muchas secuencias de intensificador de genes de mamífero (p. ej., globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se utiliza un intensificador de un virus de célula eucariótica. Entre los ejemplos se incluyen el intensificador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), el intensificador del promotor temprano del citomegalovirus, el intensificador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y los intensificadores de adenovirus. Ver también Yaniv, 1982, *Nature* 297:17-18 para una descripción de elementos intensificadores para la activación de promotores eucarióticos. El intensificador puede procesarse en el vector en una posición 5' o 3' en la secuencia codificante de anticuerpo anti-PD-1, aunque preferentemente está localizado en un sitio 5' respecto al promotor.

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (levaduras, hongos, células de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también pueden contener las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias se encuentran normalmente disponibles de las regiones 5' y, ocasionalmente, 3' no traducidas de los ADN o ADNc eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm codificante del anticuerpo anti-PD-1. Un componente de terminación de transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Ver el documento n.º WO94/11026 y el vector de expresión dado a conocer en el mismo. En algunas realizaciones, pueden expresarse anticuerpos anti-ANGPT2 utilizando el sistema CHEF. Ver, p. ej., la patente US n.º 5.888.809.

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en la presente memoria son las células procarióticas, de levadura o eucarióticas superiores indicadas anteriormente. Entre los procariotas adecuados para este fin se incluyen eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacteriáceas, tales como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p. ej., *B. licheniformis* 41 P dado a conocer en el documento n.º DD 266.710, publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación *E. coli* preferente es *E.*

*coli* 294 (ATCC n.º 31.446), aunque resultan adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC n.º 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC n.º 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

Además de procarióticas, los microorganismos eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levaduras, resultan adecuados como huéspedes de clonación o expresión para los vectores codificantes de anticuerpo anti-PD-1. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el utilizado más habitualmente de entre los microorganismos huésped eucarióticos. Sin embargo, se encuentran habitualmente disponibles y resultan útiles en la presente memoria varios otros géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces*, tales como, p. ej., *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC n.º 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC n.º 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC n.º 24.178), *K. waltii* (ATCC n.º 56.500), *K. drosophilum* (ATCC n.º 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastors* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como, p. ej., los huéspedes *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-PD-1 glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen las células vegetales y de insecto, incluyendo, p. ej., numerosas cepas y variantes baculovíricas y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de la seda). Se encuentra públicamente disponible una variedad de cepas víricas para la transfección, p. ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden utilizarse particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Como huéspedes también pueden utilizarse cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden incorporarse en vectores víricos, es decir, el polinucleótido codificante del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo se introduce en el vector vírico y después se expresa en el cuerpo del paciente después de la infección con el virus.

En otro aspecto, se lleva a cabo la expresión del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo en células de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario y se encuentran ampliamente disponibles una serie de técnicas. Son ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles, la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC n.º CRL 1651), la línea renal embrionaria humana (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36: 59), células renales de hámster neonato (BHK, por sus siglas en inglés; ATCC n.º CCL 10), células ováricas de hámster chino/ DHFR1 (CHO, Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216; p. ej., DG44), células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251), células renales de mono (CV1, ATCC n.º CCL 70), células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC n.º CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (HELA, por sus siglas en inglés; ATCC n.º CCL 2), células renales caninas (MDCK, ATCC n.º CCL 34), células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC n.º CRL 1442), células pulmonares humanas (W138, ATCC n.º CCL 75), células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC n.º CCL51), células TR1 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68), células MRC 5, células FS4 y línea de hepatoma humana (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación anteriormente indicados para la producción de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y se cultivan en medios nutritivos convencionales, modificados según resulte apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes codificantes de las secuencias deseadas.

Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria pueden cultivarse en una variedad de medios. Para el cultivo de las células huésped resultan adecuados medios disponibles comercialmente, tales como medio F10 de Ham (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma-Aldrich Co.), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co.) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM, por sus siglas en inglés), Sigma-Aldrich Co.). Además, pueden utilizarse como medios de cultivo para las células huésped, cualquiera de los medios descritos en una o más de las referencias siguientes: Ham et al., 1979, Meth. Enz. 58: 44, Barnes et al., 1980, Anal. Biochem. 102: 255, y las patentes US n.º 4.767.704, n.º 4.657.866, n.º 4.927.762, n.º 4.560.655, n.º 5.122.469, y documentos n.º WO 90/103430 y n.º WO 87/00195. Cualquiera de dichos medios puede suplementarse según resulte necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como gentamicina), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales del orden micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También pueden incluirse otros suplementos a concentraciones apropiadas que serían conocidas por el experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquellas previamente utilizadas con la célula huésped seleccionada para la expresión, y resultarán evidentes para el experto habitual en la materia.

Al utilizar técnicas de recombinación, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplasmático o directamente secretarse al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, las células pueden romperse para liberar las proteínas como primera etapa. Pueden eliminarse los residuos particulados, ya sean células huésped o sean fragmentos lisados, por ejemplo mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-167 describe un procedimiento para el aislamiento de anticuerpos que son secretados al espacio periplasmático de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en la presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, por sus siglas en inglés) durante aproximadamente 30 minutos. Pueden eliminarse los residuos celulares mediante centrifugación. En el caso de que el anticuerpo se secrete al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar, utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasas, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores a fin de inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes adventicios. Puede utilizarse una variedad de métodos para aislar el anticuerpo respecto de la célula huésped.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, en donde la cromatografía de afinidad es una técnica de purificación habitual. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. Puede utilizarse proteína A para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas gamma1, gamma2 o gamma4 humanas (ver, p. ej., Lindmark et al., 1983 J. Immunol. Meth. 62:1-13). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para gamma3 humano (ver, p. ej., Guss et al., 1986 EMBO J. 5:1567-1575). La matriz a la que se une el ligando de afinidad con mayor frecuencia es agarosa, aunque se encuentran disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poro controlado o el poli(estiréndivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos de los que pueden conseguirse con la agarosa. En el caso de que el anticuerpo comprenda un dominio C<sub>H3</sub>, resulta útil para la purificación la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). También se encuentran disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas, dependiendo del anticuerpo que va a recuperarse, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC de fase inversa, la cromatografía en sílice, la cromatografía en heparina, la cromatografía de SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna con ácido poliaspártico), el cromatoenfoco, SDS-PAGE y la precipitación con sulfato amónico.

Tras cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a una cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5 y 4,5, normalmente llevada a cabo a bajas concentraciones salinas (p. ej., entre aproximadamente 0 y 0,25 M de sal).

También se incluyen ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de baja, moderada y alta astringencia, en particular bajo condiciones de alta astringencia, tal como se define en la presente memoria, a la totalidad o a una parte (p. ej., la parte codificante de la región variable) de la secuencia de nucleótidos representada por la secuencia o secuencias polinucleótidas aisladas que codifican un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de anticuerpo. La parte hibridante del ácido nucleico hibridante habitualmente presenta una longitud de por lo menos 15 (p. ej., 20, 25, 30 o 50) nucleótidos. La parte hibridante del ácido nucleico hibridante es por lo menos 80 %, p. ej., por lo menos 90 %, por lo menos 95 % o por lo menos 98 % idéntica a la secuencia de una parte o la totalidad de un ácido nucleico codificante de un polipéptido anti-PD-1 (p. ej., una región variable de cadena pesada o cadena ligera), o su complemento. Los ácidos nucleicos hibridantes del tipo descrito en la presente memoria pueden utilizarse, por ejemplo, como una sonda de clonación, un cebador, p. ej., un cebador de PCR, o una sonda diagnóstica. En un aspecto, la expresión "condiciones de alta astringencia" se refiere a sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5xSSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 50 %, siguiendo procedimientos estándares de transferencia Southern durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces cada vez durante 15 minutos utilizando 0,2xSSC, SDS al 0,2 % a 65 °C.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 108 a 123.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 92 a 107.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 131, SEQ NO: 133, SEQ NO: 135, SEQ NO: 137 o SEQ NO: 139.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ NO: 130, SEQ NO: 132, SEQ NO: 134, SEQ NO: 136 o SEQ NO: 138.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ NO: 125, SEQ NO: 127 o SEQ NO: 129.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ NO: 124, SEQ NO: 126 o SEQ NO: 128.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ NO: 143, SEQ NO: 147, SEQ NO: 149, SEQ NO: 153 o SEQ NO: 155.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ NO: 142, SEQ NO: 146, SEQ NO: 148, SEQ NO: 152 o SEQ NO: 154.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ NO: 141, SEQ NO: 145 o SEQ NO: 151.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ NO: 140, SEQ NO: 144 o SEQ NO: 150.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ NO: 159, SEQ NO: 161 o SEQ NO: 163.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ NO: 158, SEQ NO: 160 o SEQ NO: 162.

La presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ NO: 157.

En una realización, la presente exposición se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ NO: 156.

#### *Artículos de fabricación*

En otro aspecto, se incluye un artículos de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos indicados anteriormente. El artículos de fabricación comprende un envase y una etiqueta. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que resulta eficaz para el tratamiento de la afección y puede disponer de una abertura de acceso estéril. Por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica. El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno del mismo. La etiqueta sobre o asociada al envase indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la afección seleccionada. El artículos de fabricación puede comprender, además, un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir, además, otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, cargas, agujas, jeringas e impresos en el paquete con instrucciones de utilización.

La invención se describe en mayor detalle en los ejemplos a continuación.

#### **Ejemplos**

##### *Ejemplo 1: generación de anticuerpos (inmunización)*

Se inmunizaron ratones de cepa MHC tipo A, C, D, E, H o G con PD-1 humano monomérico recombinante o con proteína PD-1-Fc humana-His. El símbolo del gen para esta proteína recombinante es PDCD1 y el identificador GenelD es 5133. A continuación, se evaluó serológicamente mediante citometría de flujo utilizando células CHO-PD-1 humano, expresantes de antígeno PD-1 humano para la unión. Los ratones serológicamente positivos seleccionados recibieron un refuerzo final antes del aislamiento de células B. Todos los ratones seleccionados mostraron títulos positivos de anticuerpos en los sueros. Con serología positiva, se recolectaron los esplenocitos para la recuperación

de las células B específicas de antígeno. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo aprobado por IACUC (por sus siglas en inglés, Comité institucional de cuidado y uso de animales)

*Ejemplo 2: producción de anticuerpos anti-PD-1 humanizados*

Se convirtió el anticuerpo líder de ratón 723C2 en anticuerpos quiméricos que consistían en el dominio variable de ratón de 723C2 y un dominio constante humano IgG1WT, IgG1KO o IgG4Pro. Las secuencias de la región variable de cadena ligera (V<sub>k</sub>) del anticuerpo 723C2 de ratón y la región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) se muestran en las Tablas 1 y 2 anteriormente en la presente memoria. La IgG4Pro presenta una mutación por sustitución (Ser228Pro) que evita el intercambio de brazo Fab. La IgG1 KO presenta dos mutaciones en la región bisagra: Leu234Ala y Leu235Ala, que reducen la función efectora (ADCC). Las secuencias del anticuerpo quimérico 723C2 en formatos IgG1WT, IgG1KO e IgG4Pro humanos se muestran en la Tabla 8. El anticuerpo quimérico 723C2 en IgG1WT e IgG4Pro humanas contiene una mutación en H-CDR3, DC a DY. Sin embargo, el anticuerpo quimérico 723C2 en IgG1KO humana no presenta la mutación. La mutación en dicho sitio está resaltada en la Tabla 8. La región variable del anticuerpo seguidamente se humanizó mediante un procedimiento de diseño y cribado. Se preparó una biblioteca en la que se variaron los residuos humanos y de ratón de manera que en cualquier posición dada podía encontrarse un residuo humano o de ratón. Se construyó tal biblioteca para aquellos aminoácidos que eran diferentes entre los anticuerpos de línea germinal humana y de ratón. Solo se seleccionaron los clones que retenían la función del anticuerpo de ratón parental. Se muestran regiones variables humanizadas representativas del anticuerpo 723C2 en las Tablas 5 y 6.

De esta manera, los anticuerpos A, B, C, D y E eran anticuerpos humanizados derivados del anticuerpo 723C de ratón (clonado en un esqueleto IgG4Pro/kappa humano). Los anticuerpos A, B, C, D y E se muestran en la Tabla 7.

*Ejemplo 3: unión de anticuerpos a proteína PD-1 recombinante*

A) La cinética y la afinidad de los anticuerpos quiméricos anti-PD-1 en esqueleto de IgG4Pro humana de unión a PD-1 humano recombinante se muestran a continuación (Tabla 9). Se midieron las afinidades cinéticas y de unión utilizando un ProteOn XPR36 (Biorad, Hercules, CA) utilizando material generado a partir de la transfección transitoria tras la purificación en una sola columna.

Tabla 9

Anticuerpo	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (nM)
306E6 quimérico	1,36E+05	7,65E-03	56,4
307A3 quimérico	1,16E+05	7,40E-03	63,5
313C12 quimérico	6,71E+04	5,77E-05	0,859
414A12 quimérico	1,80E+05	2,69E-04	1,50
502H1 quimérico	5,47E+04	3,49E-04	6,39
701C1 quimérico	2,34E+04	3,05E-04	13,0
701E9 quimérico	8,83E+04	1,43E-04	1,62
703D10 quimérico	3,46E+04	3,29E-04	9,49
708E4 quimérico	4,31E+04	3,48E-04	8,08
709A6 quimérico	8,74E+04	4,83E-04	5,52
718C2 quimérico	2,84E+04	1,13E-04	3,98
723C2 quimérico	2,26E+05	5,82E-04	2,58
803E6 quimérico	1,06E+05	5,30E-04	5,02
811G3 quimérico	8,77E+04	8,01E-04	9,14
814E10 quimérico	8,07E+04	1,49E-04	1,85
820C3 quimérico	1,06E+04	2,86E-04	2,71

B) Se midieron las afinidades para anticuerpos anti-PD-1 humanizados derivados del anticuerpo 723C2 de ratón. Los datos cinéticos de unión se midieron utilizando el ProteOn XPR36 (Biorad, Hercules, CA) y se ajustaron globalmente a un modelo de unión 1:1, demostrando que las interacciones con PD-1 humano recombinante estaban comprendidas en el intervalo de 1 nM ~ 10 nM (Tabla 10). También se sometió a ensayo el anticuerpo PD1AB-6-4P (el anticuerpo en el esqueleto de IgG4Pro se dio a conocer en el documento n.º WO2017/058859 de Celgene).

Tabla 10

	k <sub>a</sub> (1/Ms)	k <sub>d</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (nM)
723C2 quimérico en IgG4Pro	2,26E+05	5,82E-04	2,58
Anticuerpo A	1,59E+05	4,34E-04	2,73
Anticuerpo B	2,59E+05	4,21E-04	1,62
Anticuerpo C	1,75E+05	4,63E-04	2,65
Anticuerpo D	2,22E+05	5,74E-04	2,58

(continuación)

	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
Anticuerpo E	1,78E+05	4,92E-04	2,77
PD1AB-6-4P	2,10E+05	4,60E-03	22,0

C) Se midieron los datos de afinidad y cinéticos para la unión de los anticuerpos anti-PD-1 a PD-1 de *Cynomolgus* en el ProteOn XPR36, y se ajustaron globalmente a un modelo de unión 1:1 (Tabla 11). También se sometió a ensayo el anticuerpo PD1AB-6-4P.

Tabla 11

Anticuerpo	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
723C2 quimérico en IgG4Pro	1,85E+05	7,21E-03	38,9
Anticuerpo A	1,78E+05	4,73E-03	26,5
Anticuerpo B	1,69E+05	5,58E-03	32,9
Anticuerpo C	1,54E+05	6,33E-03	41,0
Anticuerpo D	1,49E+05	6,74E-03	45,2
Anticuerpo E	1,73E+05	6,63E-03	38,2
PD1AB-6-4P	NA	NA	25,0

#### D) Selectividad molecular para PD-1 humano

Se evaluó la selectividad del anticuerpo anti-PD-1 para proteína PD-1 humana en un ensayo celular mediante citometría de flujo. Las células Jurkat parentales que no expresan la proteína PD-1 humana o las células Jurkat que expresan la proteína PD-1 humana se incubaron con el anticuerpo anti-PD-1 marcado con AlexaFluor 647 a las concentraciones indicadas posteriormente. Como control, se incubaron células Jurkat parentales y expresantes de PD-1, con anticuerpos de control de isotipo anti-TNP. Tras la incubación, las células se lavaron para eliminar el anticuerpo no unido, se fijaron en PFA y después se lavaron en tampón de tinción. La unión del anticuerpo a las células Jurkat se evaluó mediante citometría de flujo. Las células no teñidas también se evaluaron mediante citometría de flujo a modo de un control negativo. El anticuerpo anti-PD-1 se une selectivamente a PD-1 humano hasta por lo menos 1 micromolar, tal como indica la unión dependiente de la dosis del anticuerpo a las células Jurkat que expresan la proteína PD-1 humana y la falta de unión de anticuerpo anti-PD-1 marcado con AlexaFluor 647 a las células Jurkat parentales que carecen de expresión de PD-1. Los resultados de un experimento representativo utilizando anticuerpo C (antic. C) se muestran en la figura 1.

#### Ejemplo 4: ensayo de unión competitiva de Fc-PD-1 humano de unión a Fc-PD-L1 humano.

La Fc-PD-L1 humana se acopló con aminas en los canales 1 a 3 de un chip GLM en un instrumento BioRad ProteOn XPR36 a una concentración de 60 µg/ml; se acoplaron con aminas los tres anticuerpos de ensayo: anticuerpo C, MK-3475 (pembrolizumab) y PD1AB-6-4P, en los canales 4, 5 y 6, respectivamente, a 30 µg/ml. Se inyectó Fc-PD1 humano en los canales 1 a 6 en la superficie del chip a una concentración de 25 nM. El sensograma indicaba la unión específica entre PD-L1 y el receptor de PD-1 (figura 2A). Se premezcló anticuerpo C 500 nM, MK-3475 y PD1AB-6-4P con Fc-PD-1 25 nM y se inyectó como analito en todos los canales en el chip a fin de evaluar si los anticuerpos individuales inhibían la unión de PD-L1 a PD-1. Tanto el anticuerpo C como PD1AB-6-4P no compiten con PD-L1 para la unión al antígeno PD-1, tal como muestran los sensogramas. MK-3475 y PD-L1 son potenciales bloqueantes mutuos de la unión a PD-1, según los sensogramas de no unión observados en el ensayo de competición (figura 2B).

#### Ejemplo 5. Unión incrementada de PD-L1 a PD-1 en la presencia de anticuerpo agonista anti-PD-1.

Se interrogaron las interacciones PD-1/PD-L1 en la presencia del anticuerpo agonista de PD-1 723C2 en esqueleto IgG4Pro humano sin la mutación DC a DY en H-CDR3. Se utilizaron múltiples ensayos para demostrar que el anticuerpo 723C2 potenció la unión de PD-L1 a PD-1. Se utilizó un ensayo bioquímico basado en ELISA para evaluar la unión de PD-1 a PD-L1 unido a la placa (BPS Bioscience). Se recubrieron microplacas blancas de 96 pocillos con 50 µl de PD-1 a una concentración de 2 µg/ml en PBS durante la noche a 4 °C. Se separaron los sobrenadantes y las placas se lavaron tres veces con inmunotampón 1X proporcionado por el fabricante BPS Bioscience (n.º de cat. 72005) seguido del bloqueo con tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente (TA). Se añadieron los anticuerpos, junto con los controles pertinentes, seguido de la adición de PD-1 biotina a 0,5 ng/ml (10 ng) durante dos horas a temperatura ambiente. Las placas se bloquearon con tampón de bloqueo durante 10 minutos. Se añadió un anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano picante-estreptavidina a las placas lavadas durante una hora, seguido del lavado con tampón de ensayo PD-1. Las placas se bloquearon durante 10 minutos. Se añadió mezcla de sustrato quimioluminiscente a la placa inmediatamente antes de la lectura. La señal quimioluminiscente se leyó en un luminómetro (Envision) o en una placa de microtitulación capaz de leer la quimioluminiscencia.

Se observaron interacciones potenciadas de PD-1 con PD-L1 en la presencia de anticuerpo 723C2, tal como indica la

señal quimioluminiscente incrementada en comparación con las muestras tratadas con control de isotipo (figura 3A). El anticuerpo 723C2 se designa como 723C2-4P en la figura 3A. Lo anterior contrasta con MK3475, un anticuerpo anti-PD-1 antagonista conocido, que bloqueó la interacción PD-L1-PD-1. El anticuerpo PD1AB-6-4P demostró la potenciación limitada de PD-1-PD-L1 en el presente ensayo (figura 3A).

Se utilizó un ensayo celular para confirmar los resultados del ELISA, demostrando la potenciación de las interacciones PD-1/PD-L1 en la presencia del anticuerpo 723C2. En este caso, se evaluó la interacción de PD-1/PD-L1 mediante medición de la unión de PD-1 soluble a células CHO sobreexpresantes de PD-1 con un ensayo de unión de receptor-ligando DELFIA (por sus siglas en inglés, inmunoensayo de fluorescencia de lantánido potenciada por disociación) (Perkin Elmer).

Se sembraron en placa 10.000 células y se incubaron durante la noche en un incubador a 37 °C + 5 % de CO<sub>2</sub> (incubador humidificado). Se añadió PD-L1 EC 10 marcado con biotina (130 nM) y 10 µl de anticuerpo de PD-1 a cada pocillo y se incubó a TA durante 1 hora. Las placas se lavaron dos veces con 50 µl de tampón de lavado 1X TRF. Se añadieron 20 µl de reactivo Eu-estreptavidina a la placa de ensayo y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió solución de potenciación y se incubó durante 30 minutos a TA. Las placas se leyeron en un lector de placas de fluorescencia (excitación: 320 o 340 nm; emisión: 615 nm). En el presente ensayo, y en confirmación del ensayo de ELISA, la presencia del anticuerpo 723C2 en este ensayo celular potenció las interacciones PD-1/PD-L1 (figura 3B). El anticuerpo 723C2 se designa como 723C2-4P en la figura 3B.

Se expresó un segundo ensayo celular en el que PD-1 se expresaba sobre células CHO para evaluar las interacciones PD-1/PD-L1. En dicho ensayo, la unión de multímero de PD-L1 a células CHO expresantes de PD-1 se midió mediante citometría de flujo. Se añadieron 50 µl de 2×10<sup>6</sup> células/ml a cada pocillo (100.000 células/pocillo). Se centrifugaron las células y se resuspendieron en 50 µl de las concentraciones de anticuerpo indicadas y se incubaron durante 60 minutos sobre hielo. Se combinaron PDL1-biotina y estreptavidina-APC en tampón de tinción (1 µg/ml de PDL1-biotina + 0,25 µg/ml de estreptavidina-APC). Se añadieron 50 µl de mezcla 2X PDL1-biotina/estreptavidina-APC a las células y se incubaron sobre hielo durante 60 minutos. Se lavaron las células y se resuspendieron en 180 µl de tampón de tinción + 20 µl de PFA y los datos se adquirieron en un BD LSR II. Tal como se indica en la figura 3C, dicho ensayo celular también demostró la unión incrementada de PD-L1 a PD-1 en la presencia del anticuerpo 723C2. El anticuerpo PD1A-6-4P no presentó ningún efecto sobre la unión de PD-L1, mientras que el anticuerpo antagonista MK3475 inhibió la unión de PD-L1 a PD-1 (figura 3C). El anticuerpo 723C2 se designa como 723C2-4P en la figura 3C.

También se llevó a cabo un ensayo Delphia-EU TRF de CHO PD-1-PD-L1 tal como se ha descrito anteriormente, con anticuerpo C, anticuerpo PD1AB-6-4P, anticuerpo 1-4Pro, anticuerpo PD1B1090-4Pro, anticuerpo PD1B1094-4Pro y anticuerpo ANB-030-4Pro. El anticuerpo 1-4Pro comprende las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo 1 descrito en el documento n.º WO2019/168745 de Eli Lilly, en un esqueleto de IgG4-Pro. El anticuerpo PD1B1090-4Pro y el anticuerpo PD1B1094-4Pro comprenden las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de PD1B1090 y PD1B1094, respectivamente, descritas en el documento n.º WO2018/226580 de Janssen Biotech, en un esqueleto de IgG4-Pro. El anticuerpo ANB-030-4Pro comprende las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo ANB-030, descritas bajo el número CAS 2412764-40-8 en un esqueleto de IgG4-Pro (también corresponde a las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de APE12537, descritas en el documento n.º WO2020/247648 de Anaptysbio). También se incluyó un anticuerpo anti-TNP en un esqueleto de IgG4-Pro.

El anticuerpo C mostró una potenciación consistente (N=3) de la unión PD-1/PD-L1 de una manera dependiente de la concentración (figura 3D). Ninguno de los demás agonistas de anti-PD-1 mostró potenciación de la unión PD-1/PD-L1 (figura 3D).

#### *Ejemplo 6: ensayos celulares funcionales, inhibición de la activación de NFAT en un ensayo de informador agonista de THP-1/Jurkat-PD-1*

Se desarrolló un ensayo de cocultivo de NFTA de THP-1/Jurkat PD1 para evaluar la actividad agonista de anticuerpos anti-PD1 generados a partir de múltiples campañas. La línea celular THP-1 se obtuvo de la ATCC. La línea celular informadora Jurkat se generó internamente. Las células informadoras Jurkat sobreexpresan PD-1 humano (PD-1<sub>h</sub>) sobre la superficie celular y también expresan un informador luciferasa controlado por NFTA, para medir el estado de activación de las células en respuesta a la estimulación. Las células Jurkat PD1 NFAT se activan con un BiTE CD3xCD33 en la presencia de células THP-1. El brazo anti-CD33 del BiTE se une a CD33 expresado sobre las células THP-1, mientras que el brazo anti-CD3 se une a la molécula de CD3 sobre las células Jurkat. El BiTE sirve para acoplarse a las células THP-1 y Jurkat resultando en la formación de una sinapsis inmunitaria entre las dos células, a la vez que activa las células Jurkat. La activación de las células Jurkat PD-1 NFAT se mide mediante el informador luciferasa controlado por NFAT. Este ensayo se llevó a cabo en la presencia de anticuerpos anti-PD1 para identificar los anticuerpos agonistas. Las moléculas que mostraban una reducción de 20 % o superior en la activación, tal como indica la pérdida de señal de luciferasa, se clasificaron como anticuerpos agonistas (Tabla 12). Los anticuerpos anti-PD-1 306E6 a 820C3 en la Tabla 12 se encontraban en un esqueleto de IgG1 de ratón. Se seleccionaron varios de dichos anticuerpos para el perfilado adicional en un esqueleto de IgG4Pro humano (indicado como anticuerpos quiméricos en la Tabla 12).

Tabla 12

Anticuerpo	Valores de IC <sub>50</sub> (nM), inhibición de la actividad de NFAT	Valores de E <sub>max</sub> (%), inhibición de la actividad de NFAT
306E6	1,14	45,5
307A3	1,03	42,6
313C12	0,37	42,2
414A12	0,39	45,0
502H1	0,34	48,9
701C1	1,69	53,2
701E9	0,22	46,0
703D10	10,9	47,4
708E4	0,17	48,7
709A6	0,04	29,8
718C2	0,82	50,8
723C2	0,14	43,7
803E6	0,38	48,3
811G3	0,14	44,5
814E10	0,25	40,7
820C3	0,14	48,7
718C2 quimérico	0,38	44,4
703D10 quimérico	0,39	41,9
723C2 quimérico	0,13	42,6
820C3 quimérico	0,14	40,0

5 *Ejemplo 7: ensayos celulares funcionales. Inhibición de la producción de IFN $\gamma$  a partir de esplenocitos PD-1 "knockin"*

El ensayo de células primarias principal utilizado para seleccionar los anticuerpos anti-PD1 principales fue el ensayo de esplenocitos de ratón PD1\_h *knockin*. Se recolectaron los bazo de los ratones C57BL/6 que expresaban PD1 humano en lugar de PD1 de ratón. Se aislaron los esplenocitos a partir de los bazo y se activaron con anti-CD3 (clon 2C11) a una concentración de 0,1  $\mu$ g/ml. Se midió la activación de las células T tras 48 horas mediante cuantificación de los niveles de IFN $\gamma$ \_m mediante análisis MSD (Meso Scale Discovery). El ensayo se llevó a cabo en la presencia de anticuerpos anti-PD1 seleccionados a partir del ensayo de cribado de THP-1/Jurkat PD1 NFAT. Las moléculas principales identificadas en dicho ensayo se seleccionaron basándose en el % de inhibición de IFN $\gamma$ \_m (50 % o superior) y el clado de secuencia. Los valores de inhibición e IC<sub>50</sub> se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Anticuerpo	Valores de IC <sub>50</sub> (pM), media, inhibición de IFN $\gamma$	Valores de Emax (%), media, inhibición de IFN $\gamma$
306E6	22	19,5
703D10	3205	65
313C12	459	79
718C2	995	64,5
814E10	74,2	63
708E4	915	73,5
723C2	121,5	74
820C3	205	82

20 *Ejemplo 8: ensayos celulares funcionales. Inhibición de la producción de IFN $\gamma$  a partir del ensayo de PBMC humanas*

Los anticuerpos anti-PD-1 agonistas se caracterizaron adicionalmente para su capacidad de modular la actividad funcional de las células T, mediante la producción de IFN $\gamma$ , en un ensayo de células primarias humanas. Se aislaron las PBMC a partir de sangre completa humana y se activaron con 1,5 pM de anti-CD3 (clon OKT3, BioLegend). Se evaluó la activación y función de las células T tras 72 horas mediante cuantificación de los niveles de IFN $\gamma$ \_h mediante análisis de MSD. Los anticuerpos anti-PD-1 agonistas identificados fueron capaces de reducir la secreción de IFN $\gamma$  en comparación con las células tratadas con control de isotipo (Tabla 14A).

Tabla 14A

Anticuerpo	Valores de IC <sub>50</sub> (pM), media geom., inhibición de IFN $\gamma$	Valores de Emax (%), media, inhibición de IFN $\gamma$
723C2 quimérico en IgG4Pro	18,0	66,5

(continuación)

Anticuerpo	Valores de IC <sub>50</sub> (pM), media geom., inhibición de IFN $\gamma$	Valores de E <sub>max</sub> (%), media, inhibición de IFN $\gamma$
820C3 quimérico en IgG4Pro	38,5	56,7
Anticuerpo A	7,4	49,0
Anticuerpo B	18,4	48,9
Anticuerpo C	17,7	46,8
Anticuerpo D	18,0	50,1
Anticuerpo E	8,1	47,8
PD1AB-6-4P	31,5	40,1

En el presente ensayo también se sometieron a ensayo anticuerpo C, anticuerpo 1-4Pro, anticuerpo PD1B1090-4Pro, anticuerpo PD1B1094-4Pro, anticuerpo ANB-030-4Pro y abatacept. Se muestran los resultados en la Tabla 14B. En dicho ensayo también se sometieron a ensayo el anticuerpo C, las regiones variables del anticuerpo 1-4Pro, anticuerpo PD1B1090-4Pro, anticuerpo PD1B1094-4Pro y anticuerpo ANB-030-4Pro en un esqueleto de IgG1 de tipo salvaje y en un esqueleto de IgG1 KO, y abatacept. Se muestran los resultados en la Tabla 14C, resumida a continuación. En cada experimento, se sometieron a ensayo cinco donantes.

Tabla 14B

Anticuerpo	Valores de IC <sub>50</sub> (pM), media geom., inhibición de IFN $\gamma$	Valores de E <sub>max</sub> (%), media, inhibición de IFN $\gamma$
Anticuerpo C	0,03	59
Anticuerpo 1-4Pro	0,01	55
PD1B1090-4Pro	0,79	72
PD1B1094-4Pro	0,46	64
ANB-030-4Pro	0,27	66
Abatacept	0,39	66

Tabla 14C

Anticuerpo	Valores de IC <sub>50</sub> (pM), media geom., inhibición de IFN $\gamma$	Valores de E <sub>max</sub> (%), media, inhibición de IFN $\gamma$
Anticuerpo C	0,03	59
Antibody 1-IgG1WT	0,01	46
PD1B1090-IgG1WT	0,07	83
PD1B1094-IgG1WT	0,12	79
ANB-030-IgG1WT	0,03	78
Abatacept	0,39	66

La inhibición de IFN $\gamma$  para las regiones variables del anticuerpo 1-4Pro, anticuerpo PD1B1090-4Pro, anticuerpo PD1B1094-4Pro y anticuerpo ANB-030-4Pro en un esqueleto de IgG1 KO era inferior a 40 %, con valores de IC<sub>50</sub> superior a 30 nM.

*Ejemplo 9: ensayos celulares funcionales, inhibición de la producción de IL-17A a partir del ensayo de cocultivo de Th17-monocitos*

Se sometieron a ensayo anticuerpos agonistas anti-PD-1 para la inhibición funcional de la secreción de IL-17 por las células T diferenciadas Th17. Se desarrolló un ensayo de cocultivo de células primarias para evaluar la modulación de IL-17 por PD-1. Las células T primarias humanas aisladas a partir de PBMC se diferenciaron en Th17 bajo las condiciones de polarización siguientes. Se estimularon células T CD4 con 0,5  $\mu$ g/ml de anti-CD3 unido a placa (clon UCHT1) durante 4 días en medio de polarización de Th17 (medio X-VIVO15 + IL1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-23 (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-2 (2 ng/ml), TGF $\beta$  (0,5 ng/ml), 5  $\mu$ g/ml de anti-IL4 y 5  $\mu$ g/ml de anti-IFN $\gamma$ ). Tras 4 días, se extrajeron las células de las placas recubiertas con anti-CD3 y se transfirieron a matraces que contenían medio de polarización de Th17. Tras la diferenciación, las células Th17 se dejaron en reposo durante por lo menos 3 días y después se cocultivaron con los monocitos autólogos y se estimularon nuevamente con 40 fM de anti-CD3 (clon OKT3) en la presencia de los anticuerpos de PD-1. Se requirió el sistema de cocultivo debido a los requisitos de Fc necesarios para los anticuerpos anti-PD-1 para demostrar la actividad agonista. Se observó inhibición de IL-17 en el presente ensayo en la presencia de anticuerpos anti-PD-1 agonistas. Se muestra la IC<sub>50</sub> de los anticuerpos y la inhibición máxima de la respuesta de IL-17 en la tabla a continuación (Tabla 15). Se comparó la inhibición máxima con un anticuerpo de control de isotipo.

Tabla 15

Anticuerpo	Valores de IC <sub>50</sub> (pM), media geom., inhibición de IL-17A	Valores de E <sub>max</sub> (%), media, inhibición de IL-17A
723C2 quimérico en IgG4Pro	14,4	70,0
Anticuerpo A	41,1	69,8
Anticuerpo B	25,3	63,4
Anticuerpo C	32,5	62,9
Anticuerpo D	31,9	63,9
Anticuerpo E	8,1	59,2
PD1AB-6-4P	175,8	67,5

Ejemplo 10: ensayos celulares funcionales, inhibición de la producción de IL-21 a partir del ensayo de cocultivo de Tfh-monocitos

Se desarrolló un ensayo para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 agonistas de inhibir la actividad de las células T foliculares ayudantes (Tfh) *in vitro*. Las células T CD4 y monocitos autólogos se obtuvieron de ALLCELLS. Las células T se polarizaron al linaje Tfh mediante activación de las células con CD3/CD28 Dynabeads Human T-Activator (Gibco) en la presencia de IL-23 (25 ng/ml) y TGFβ (5 ng/ml) durante 5 días y después se combinaron con monocitos autólogos en la presencia de anti-CD3 4,5 pM (clon OKT3, BioLegend) y anticuerpos anti-PD-1 agonistas tras lavar las células y eliminar las perlas de activación. Veinticuatro horas después, se recolectaron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para la presencia de IL-21 (kit de IL-1 humano Meso Scale Discovery, MSD V-Plex). La producción de IL-21 de células diferenciadas en Tfh estimuladas nuevamente se inhibió con anticuerpos anti-PD-1 agonistas. Se muestran valores representativos de inhibición IC<sub>50</sub> y E<sub>max</sub> en la Tabla 16.

Tabla 16

Anticuerpo	Valores de IC <sub>50</sub> (pM), media geom., inhibición de IL-21	Valores de E <sub>max</sub> (%), media, inhibición de IL-21
723C2 quimérico en IgG4Pro	12	85
Anticuerpo C	6	84
PD1AB-6-4P	50	71

Ejemplo 11: función de las interacciones de FcγR sobre la actividad agonista de PD-1

La función de las interacciones de Fc-receptor de Fcγ sobre la actividad funcional de los anticuerpos agonistas se caracterizó mediante la utilización de anticuerpos anti-PD-1 agonistas candidatos en diferentes formatos de esqueleto (IgG1 de tipo salvaje, IgG1 KO o IgG4 Pro) o fragmentos de anticuerpo divalente (fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). La actividad funcional de las variantes de anticuerpo se evaluó a partir de la capacidad de modular la producción de IFNγ a partir de células T activadas en el ensayo de PBMC humanas descrito anteriormente. La actividad agonista funcional, medida a partir de la reducción de la producción de IFNγ, se pierde con los fragmentos divalentes F(ab')<sub>2</sub> de los anticuerpos parentales 723C2 y 820C3 (figuras 4A y 4B). En contraste, el anticuerpo de longitud completa en un esqueleto de IgG4Pro humano inhibió la producción de IFNγ de una manera dependiente de la dosis (figuras 4A y 4B, designados 723C2-4P y 820C3-4P, respectivamente). En estos ensayos, se aislaron las PBMC humanas a partir de sangre completa y se activaron con 1,5 pM de anti-CD3 clon OKT3 en la presencia del anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo anti-PD-1 indicado. Tras 72 horas, se midieron los niveles de citoquina IFN gamma human en el sobrenadante mediante análisis MSD.

Debido a que este análisis sugirió que las interacciones de Fc resultan necesarias para la actividad agonista funcional del anticuerpo anti-PD1, se generó el anticuerpo 723C2 en esqueletos de IgG1WT, IgG1KO e IgG4Pro para caracterizar adicionalmente estas interacciones (723-IgG1WT, 723-IgG1 KO y 723-IgG4Pro, respectivamente, en la Tabla 17, posteriormente). Tanto IgG1 WT como IgG4 Pro se unen a receptores de Fc humanos en diferente grado, mientras que el esqueleto IgG1 KO presenta una unión muy reducida a los receptores de Fc. El anticuerpo anti-PD-1 agonista en IgG4 Pro demostró el grado más alto de inhibición de IFNγ en el ensayo de PBMC humanas, mientras que el anticuerpo en IgG1 KO demostró una actividad muy reducida (Tabla 17). En conjunto, estos datos indican que el agonismo funcional del anticuerpo anti-PD-1 es dependiente de las interacciones de Fc.

Tabla 17

	% de inhibición de IFNγ (media, SD)	IC <sub>50</sub> (media geom. (nM), SD)
723-IgG4Pro	57±17	0,03±0,136
723-IgG1WT	45±16	0,015± 0,021
723-IgG1KO	29±17	0,02± 0,4

Ejemplo 12: modelo *in vivo*. Modelo de EICH de células T CD4<sup>+</sup> xenogénicas

Se utilizó un modelo *in vivo* de ratón de EICH de células T CD4<sup>+</sup> xenogénicas para someter a ensayo la eficacia de los anticuerpos de PD-1 agonistas. Ocho ratones NSG por grupo (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>/J2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ, The Jackson Laboratory) recibieron mediante inyección i.v. 5×10<sup>6</sup> células T CD4<sup>+</sup> (purificadas mediante selección negativa) procedentes de leukopacs de donantes sanos. Los ratones recibieron dos dosis a la semana a 0,625 mg/kg IP según lo siguiente; grupo 1: 723 (IgG4-Pro); grupo 2: PD1AB-6-4P (IgG4-Pro); grupo 3: isotipo anti-TNP (IgG4-Pro); grupo 4: avelumab (IgG1\_h-LALAPG); grupo 5: isotipo anti-TNP (IgG1\_h-LALAPG); grupo 6: CTLA4-Ig (IgG1\_h-LALA). TNP es trinitrofenol LALA representa las mutaciones Leu234Ala/Leu235Ala utilizadas habitualmente para interrumpir la función efectora de los anticuerpos. PG representa la mutación Pro329Gly, que elimina la función efectora al bloquear la unión a receptores de Fc gamma.

Se llevaron a cabo tres repeticiones experimentales, cada una con un donante único. En la semana cuatro, se observó una inhibición significativa de la acumulación de células humanas en los grupos 1, 2 y 6, en comparación con sus controles de isotipo correspondiente para todos los donantes sometidos a ensayo (Tabla 18). La cuantificación de las citoquinas inflamatorias en la semana cuatro mostró una reducción significativa de los niveles de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10 humanas en todos los donantes (Tabla 19). También se sometieron a ensayo IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70 e IL-13 humanas, aunque todas se encontraban por debajo del límite de detección para el ensayo.

Tabla 18: acumulación de células CD45<sup>+</sup> humanas

	% de células CD45 <sup>+</sup> h (media $\pm$ SD)		
	Donante 1	Donante 2	Donante 3
Grupo 1	2,23 (2,83)	3,52 (6,37)	0,63 (0,68)
Grupo 2	14,86 (13,43)	3,63 (3,12)	1,31 (0,92)
Grupo 3	43,57 (18,33)	21,92 (14,73)	15,07 (14,48)
Grupo 4	40,70 (19,29)	21,09 (9,41)	24,70 (16,73)
Grupo 5	48,98 (17,87)	25,22 (14,73)	19,86 (3,95)
Grupo 6	3,24 (1,88)	6,63 (5,50)	1,76 (1,96)

Tabla 19: producción de citoquinas plasmáticas humanas

	IFN $\gamma$ h (pg/ml, media $\pm$ SD)			TNF $\alpha$ h (pg/ml, media $\pm$ SD)			IL-10 h (pg/ml, media $\pm$ SD)		
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 1	Donante 2	Donante 3
Grupo 1	331 (333)	6616 (16780)	372 (742)	1 (1)	8 (17)	1 (1)	1 (1)	2 (5)	0 (0)
Grupo 2	11475 (18275)	2846 (3079)	631 (606)	9 (10)	6 (4)	1 (1)	6 (8)	1 (1)	0 (0)
Grupo 3	40323 (36540)	24450 (15273)	11967 (9048)	18 (7)	43 (27)	19 (13)	12 (6)	12 (6)	4 (2)
Grupo 4	76077 (61582)	28643 (12275)	13302 (11700)	29 (15)	37 (15)	19 (14)	18 (7)	10 (3)	4 (3)
Grupo 5	39655 (48118)	20180 (9671)	15435 (10619)	21 (9)	34 (14)	20 (9)	16 (8)	11 (7)	4 (3)
Grupo 6	837 (1498)	7163 (9580)	871 (1907)	1 (1)	13 (15)	3 (4)	1 (1)	8 (15)	1 (1)

Ejemplo 13: estudios farmacocinéticos en monos *Cynomolgus*

Se evaluó la farmacocinética (FC) del anticuerpo C en monos *Cynomolgus* macho de origen chino tras una única dosis de bolo intravenoso (i.v.) de 0,1, 0,3 y 1,5 mg/kg o una dosis subcutánea (s.c.) de 1,5 mg/kg (n=3 por grupo). Se determinaron las concentraciones en suero del anticuerpo C utilizando dos formatos diferentes de inmunoensayo MSD: (1) un ensayo de captura y detección de fármaco genérico "total" antihumano, y (2) un ensayo de fármaco "libre" con captura de antígeno (PD1-ECD) y detección de antihumano. Los perfiles FC de ambos ensayos eran superponibles, sugiriendo que PD-1<sub>s</sub> endógeno no interfería con la medición del anticuerpo C y presentó poco efecto sobre TMDD. El anticuerpo C demostró CL dependiente de la dosis (tanto en el ensayo libre como en el "total") entre 0,1 y 0,3 mg/kg, sugiriendo contribuciones de la disposición del fármaco mediada por la diana (TMDD, por sus siglas en inglés) al aclaramiento global. El resumen de parámetros farmacocinéticos de NCA para cada una de las dosis respectivas se muestra en la Tabla 20, a continuación.

Tabla 20

Dosis (mg/kg)	Vía	CL (ml/d/kg)	Vc (ml/kg)	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ )	T <sub>1/2</sub> (días)	MRT (días)	F (%)
0,1	i.v.	14,3	35,6	171	2,9	4,1	-
0,3	i.v.	6,2	38,6	1.190	8,7	12,1	-
1,5	i.v.	3,0	33,9	12.400	18	25	-
1,5	s.c.	-	-	12.000	-	22,7	96,9

*Ejemplo 14: transfección y producción en células CHO y datos biofísicos*

Transfección y producción en células CHO:

Se transfectaron células CHO-E a razón de  $\sim 2 \times 10^6$  células/ml en CHO Irvine BalanCD Transfectory + L-glutamina 4 mM (o Glutamax). Las cantidades requeridas para 1 l de transfección fueron 0,15 mg de ADN HC más 0,3 mg de ADN LC y 1,05 mg de ADN de relleno (esperma de arenque) y 0,15 mg de ADN XBP1. Se diluyó el ADN en 100 ml de OptiPro SFM y se filtró a esterilidad a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Se añadieron 0,75 ml de reactivo de transfección Mirus TransIT Pro a la mezcla de ADN diluida y se añadió inmediatamente el complejo de ADN a las células CHO-E preparadas y el matraz de agitación se devolvió al agitador a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> a 140 rpm. Veinticuatro horas después de la transfección, la temperatura se cambió a 32 °C; se añadieron 2 ml de agente antiagregación Gibco y se añadieron 100 ml de suplemento Irvine Transfectory a las células transfectadas. Cinco días después de la transfección, se cambió la temperatura del agitador a 30 °C. Se añadieron 200 ml de suplemento Transfectory de Irvine entre el día 5 o el día 7, dependiendo de cuando los niveles de glucosa habían caído entre 2 g/l y 1 g/l. Los cultivos transfectados se mantuvieron durante 10 días. Se llevó a cabo la recolección centrifugando las células, seguido de la filtración a esterilidad a través de un filtro PES de 0,2  $\mu\text{m}$  (Thermo Scientific).

Tras la recolección, los sobrenadantes de cultivo celular clarificados se muestrearon para el título con el instrumento ForteBio/Pall Octet Red 96 con biosensores de proteína A, del modo siguiente.

Los títulos de los anticuerpos A, C y E eran de entre 18 y 38 mg/l, con una recuperación de aproximadamente 80 % a partir de la purificación de las proteínas y más de 98 % de monómero tras la purificación mediante SEC. Se intercambió el tampón de las proteínas a un tampón final que contenía histidina-HCl 10 mM, pH 6,0, y eran estables a 4 °C durante por lo menos 4 meses y con una solubilidad de hasta 180 mg/ml en este tampón.

Tabla 21

	Columna de proteína A			Columna IEX	
	Título (mg/l)	Rendimiento (mg/l)	Rendimiento de	recuperación (mg/l)	Recuperación
Anticuerpo A	22/18	25/21	114 %/117 %	18/18	71 %/83 %
Anticuerpo C	23	22	95 %	18	83 %
Anticuerpo E	38	38	100 %	31	80 %

Tabla 22

	Calidad	Estabilidad		Solubilidad
	SEC frescas (% de M)	SEC 1 semana a 40 °C (% de M)	SEC 4 semanas a 40 °C (% de M)	AUC a 180 mg/ml (% M)
Anticuerpo A	99,08	98,41	97,55	97,7
Anticuerpo C	98,99	97,87	96,68	95,7
Anticuerpo E	98,61	97,80	96,96	99,9

AUC: ultracentrifugación analítica medida mediante el método de velocidad de sedimentación a concentraciones de 0,5 a 1 mg/ml; SEC: (por sus siglas en inglés) cromatografía de exclusión por tamaño; % de M: porcentaje de monómero.

*Ejemplo 15: anticuerpos biespecíficos*

Materiales y métodos

*Anticuerpos y reactivos de ratón.* Anti-PD1<sub>h</sub> (EH12.2H7)(Biolegend, 329912); anti-CD48<sub>h</sub> (Bio-gems, 10511-25-500); IgG1 (n.º de cat.16-4714-85), anti-CD3<sub>h</sub> (OKT3) (16-0037-85), anti-CD3<sub>h</sub> (UCHT1) (16-0038-85) y anti-CD11a (140011982) de eBiosciences; anti-hCD71 (Southern Biotech, 9670-14). Dynabeads de activador de células T aCD3/aCD28 humanas (Gibco, 11131D)

*Imagestream.* Se incubaron células Jurkat PD-1 en medio XVIVO 15 (Lonza) sobre hielo durante 10 minutos con toxina del cólera AF-488 (Life Technologies, V-34403) y anticuerpo entrecruzante (Jackson ImmunoResearch) y APC aCD3 (Biolegend, 317318), PV786 aPD-1 (Biolegend, 329930) o APC aCD48 (Sigma, SAB4700193). Las células se activaron mediante transferencia a X-VIVO 15 precalentado y se dejaron bajo incubación durante 12 minutos adicionales. La activación celular se detuvo mediante la adición de PBS-PFA al 2 % frío (aproximadamente una proporción 1:10 de células:PFA) y las células se incubaron en solución de fijación durante 20 minutos sobre hielo. Las células se lavaron y resuspendieron en XVIVO y se analizaron para la formación de caperuza y el umbral de perímetro utilizando el software Imagestream.

*Citometría de flujo.* Se incubaron  $1 \times 10^6$  células T humanas primarias Jurkat, Jurkat PD-1 o estimuladas con aCD3/aCD28 durante 1 h a 4 °C con 1 mg/ml de mAAb primarios, o donde se sometieron a ensayo moléculas biespecíficas, se generaron curvas de unión de 8 puntos a partir de una concentración inicial de 6,25 mg/ml y se diluyeron en serie 1:4. Las células fueron lavadas y teñidas durante 1 h a 4 °C con una dilución 1:100 de anticuerpo anti-Ig de ratón-PE (Life Technologies, P852) o una dilución 1:800 de F(ab')<sub>2</sub> de cabra antihumano-PE (Invitrogen AH11707), respectivamente. Se lavaron las muestras, se fijaron en tampón de fijación/lisado 1x (eBioscience, 00-5333-57) y se analizaron en un LSR2 (BD).

*Ensayo de complementación de PD-1.* Se adquirieron  $2 \times 10^4$  células T Jurkat sobreexpresantes de proteínas de fusión PD-1-PK de longitud completa y SHP1-EA intracelular de longitud completa, de DiscoverX (DRX-BI-080515A) y se cultivaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Se suspendieron las células en medio de siembra celular en placa (DiscoverX, 93-0563R4B) y se preincubaron con anticuerpos primarios de ratón o humanos a 4 °C durante 30 min. Dependiendo del experimento, se preincubaron adicionalmente células con 10 mM de inhibidor PP2 de quinasa pan-Src (Abcam, ab120308) o el análogo PP3 inactivo (Abcam, ab120617). Las células se lavaron y se trataron con o sin IgG de cabra antirratón secundario reticulante (Thermo Scientific, 31170). Las células se transfirieron a placas Opti blancas de 384 pocillos (PerkinElmer), recibieron reactivo de detección Flash (DiscoverX, 93-0247) y se leyeron en un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).

*Activación de células T hu primarias.* Se marcaron células pan-T humanas primarias (AllCells, PB009-1F) con 500 nM de violeta CellTrace (Life Technologies, n.º de cat. 34557). Se recubrieron dynabeads epoxi M450 (Invitrogen, 14011) con 2,5 mg de anticuerpos de ratón/ $10^7$  perlas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se dejaron sin estimular o se estimularon con anti-CD3 unido a placa (UCHT1) (250 y 500 ng/ml) en la presencia de perlas epoxi recubiertas con anticuerpos. Se recolectaron las células tras 96 h, se tiñeron con los anticuerpos anti-CD4 BV510 (BD 562970) y anti-CD8 PeCy7 (BD 335787) y se analizó la proliferación celular mediante dilución de violeta CellTrace en LSR2 (BD). Se estimularon las células T CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> de memoria primarias (AllCells, PB009-7F) con 1 mg/pocillo de anti-CD3 unido a placa (UCHT1) en presencia de 1 mg/pocillo de control de isotipo (ISO) unido a la placa, o anticuerpos biespecíficos (BsAb, por sus siglas en inglés), respectivamente. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo a las 72 h y se analizaron para la secreción de IL-2 e IL-10 (MSD).

*Generación de BsAb y diseño de constructo.* Se generaron anticuerpos biespecíficos (BsAbs) a partir de las secuencias publicadas de anticuerpos anti-CD48 (documento n.º US2012/0076790) y anti-PD1 (documento n.º WO 2011/110621A1) que se utilizaron como bloques constructivos. Se diseñaron constructos biespecíficos con tecnología de botón-en-ochal para facilitar la heterodimerización de dos regiones variables diana diferentes (IgG1-KO) para generar los BsAb que contenían anti-PD-1 y anti-CD48 (PD-1/CD48), o anti-PD-1 y anti-TNP como control (PD-1/ISO) (fig. 7A). Las secuencias de región variable obtenidas para las dianas respectivas se clonaron en vectores de expresión pTT-5 (licencia de National Research Council Canada) que contenían regiones constantes humanas. En resumen, las secuencias de aminoácidos de región variable se optimizaron para sus codones de expresión en mamíferos. Se clonaron cadenas ligeras y pesadas del gen V diana en el mismo vector de expresión que contenía un segmento conector de unión. Se linearizó el vector mediante digestión con enzimas de restricción utilizando sitios de reconocimiento EcoRI y NheI. Se obtuvieron secuencias de ADN para las regiones variables en forma de bloques G (ADNdc) de Integrated DNA Technologies (IDTDNA) con extremos homólogos solapantes respecto al vector y segmento conector contiguo. A continuación, se unieron los bloques G mediante el método de ensamblaje de Gibson (kit NEBuilder HiFi, New England Biolabs, n.º de cat. E5510S) siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, se completó la clonación tradicional mediante transformación de la mezcla de ensamblaje en células competentes (NEB 5-alpha C2987, New England Biolabs) y después se cultivaron durante la noche a 37 °C en placas de LB agar con 100 µg/ml de carbenicilina (Teknova). Se recolectaron colonias individuales y se cultivaron a 37 °C durante la noche en medio LB con carbenicilina. Los clones positivos para la inserción se confirmaron mediante análisis de secuencias utilizando el paquete de software Lasergene (DNASTar). El ADN plasmídico de secuencia confirmada se escaló a cultivos de 0,5 l y después se purificó mediante el kit Plasmid Plus megaprep (Qiagen, n.º de cat. 12981) siguiendo el protocolo del fabricante.

*Transfección transitoria de CHO-E.* Se transfectaron células CHO-E a razón de  $2 \times 10^6$  células/7ml en FS-CHO suplementado con glutamina 2 mM. Para un volumen de transfección de mAAb de 1 l, se diluyeron 1 mg de ADN plasmídico de cadena ligera (LC) y 0,5 mg de ADN plasmídico de cadena pesada (HC) en 100 ml de OptiPro SFM (Gibco) y se filtraron a esterilidad a través de un filtro de 0,2 µm (Millipore). Se añadieron 1,5 ml de reactivo de transfección TransIT Pro (Mirus Bio LLC) y se dejaron bajo incubación durante 15 a 30 minutos a temperatura

ambiente. A continuación, se añadió el complejo a las células CHO-E preparadas y el matraz de agitación se devolvió al agitador. Veinticuatro horas después de la transfección se añadieron 10 ml de agente antiagregación y 150 ml de CHO CD Efficient Feed B (ambos de Gibco) a las células transfectadas y la temperatura se cambió a 32 °C. Se mantuvo el cultivo transfectado durante 6 a 12 días y se monitorizaron rutinariamente durante todo el cultivo para crecimiento y viabilidad celular, y consumo de nutrientes. Se completó la recolección del cultivo mediante centrifugación a 4700 rpm a 4 °C, seguido de filtración a esterilidad.

*Purificación de los BsAb.* Se cargó el sobrenadante de cultivo recolectado en una columna HiTrap MabSelect SuRe de 1 ml de GE (n.º de cat. 11003493) preequilibrada con tampón A (DPBS, pH 7,2) a 1,0 ml/min. Se lavaron las columnas con 10 ml de cada uno de tampón A, tampón B (DPBS más NaCl 1,0 M) y tampón A nuevamente a un caudal de 1 ml/min. A continuación, se eluyeron las proteínas unidas con acetato sódico 30 mM, pH 3,5. Se neutralizó una fracción de 5 ml con 1 % volumen a volumen de acetato sódico 3 M, pH~9. El tampón final fue NaOAc 60 mM, pH~5 tras la elución de proteína A. El porcentaje de monómero era de 71 % para PD1/ISO y 63 % para PD1/CD48 según aSEC.

Los materiales purificados mediante MabSelect Sure se pulieron adicionalmente para eliminar agregados mediante intercambio catiónico. Para el intercambio iónico se utilizó una columna preempaquetada Poros GoPure HS de Thermo Fisher (n.º de cat. 4481316). Se cargó la muestra de proteína A en una columna Poros HS de 1 ml preequilibrada con tampón A (NaOAc 60 mM, pH 5,0) y se lavó la columna con 10 volúmenes de columna de tampón A. A continuación, se eluyeron las proteínas unidas con un gradiente de 0 % a 40 % de tampón B (NaOA 60 mM, NaCl 1 M, pH 5,0) en 20 volúmenes de columna a razón de 0,5 ml/min. Se agruparon las fracciones en torno al pico y se ajustó la concentración salina a NaCl 100 mM. Se filtraron a esterilidad las muestras con unidades de filtración; se midió la concentración de proteínas, se determinó el nivel de endotoxinas y se llevó a cabo SDS-PAGE, así como aSEC.

*Ensayo de luciferasa NFAT.* La línea celular informadora Jurkat PD-1 NFAT se generó en el propio laboratorio de los inventores. Se clonó PD-1 humano de GeneCopoeia (EX-B0169-M02) en un vector que se transfectó en células Jurkat (ATCC) mediante electroporación. A continuación, se transfectó el informador NFAT luciferasa (Promega E8481) en clones expresantes de PD-1, mediante electroporación. La línea celular THP-1 se adquirió de ATCC (TIB-202) y se cultivó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se resuspendieron células informadoras Jurkat PD-1 y NFAT en medio de ensayo (RPMI, HI-FBS al 2 %) y se preincubaron  $3 \times 10^4$  células/condición con dosis de BsAb (concentración inicial de 100 nM y diluciones 1:3) durante 15 min en placas Opti de fondo plano de 384 pocillos. Se añadieron células THP-1 ( $3 \times 10^4$  células/condición) y las células se estimularon con una solución 10 nM de activador aCD3xaCD33 durante 6 h a 37 °C. Se analizó el informador NFAT mediante la adición de reactivo de ensayo de luciferasa Steady-Glo® de los 15 min (Promega, E2520) y se leyeron en un lector de placas EnVision.

## Resultados

*La reticulación por CD48 y PD-1 potencia la fosforilación de PD-1.* CD48 es una balsa lipídica y proteína residente en la sinapsis inmunitaria (SI) bien conocida en linfocitos de ratón y humanos (Elishmerenei y Levi-Schaffer, 2011). Para cualificar mejor la presencia y abundancia de CD48 en balsas lipídicas respecto a la de PD-1 y CD3, los presentes inventores llevaron a cabo experimentos de ImageStream para cuantificar al nivel de células individuales la colocalización de estos receptores con coalescencia de balsas lipídicas inducida por la toxina del cólera (TC) (adición de caperuzas) en células Jurkat sobreexpresantes de PD-1. Se llevó a cabo el análisis de la colocalización de CD48, CD3 y PD-1 dentro de las caperuzas de balsa lipídica inducidas por TC, utilizando mAb marcados con fluoróforo. Este análisis mostró que, al contrario que PD-1, CD3 y C48 se observaron con facilidad dentro de las caperuzas inducidas por TC. La cuantificación del perímetro, en el que los valores inferiores de perímetro se correlacionan con la formación de caperuzas, reveló que tras la activación, la formación de caperuzas de CD48 era evidente, aunque ligeramente menos abundante que con CD3. En contraste, PD-1 normalmente no se colocalizaba con TC, concordando con la hipótesis de que PD-1 requiere un proceso activo (p. ej., la interacción con PD-L1) para ser reclutado a la SI enriquecida en balsas lipídicas (Yokosuka et al., 2012).

La presencia de CD48 en balsas lipídicas y la asociación constitutiva con quinasas Src (Lck en células T), permitió a los presentes inventores plantear la hipótesis de que, de manera similar a CD3, la aproximación de CD48 con PD-1 inducirá la activación/fosforilación de PD-1, ya que el mecanismo canónico para la activación de PD-1 requiere la fosforilación mediada por Lck de los dominios ITSM e ITIM intracelulares de PD-1 (Chemnitz et al., 2004; Parry et al., 2005; Sheppard et al., 2004). Para someter a ensayo dicha hipótesis, se generó una línea celular Jurkat personalizada para expresa una proteína de fusión de PD-1 humana con una mitad de b-galactosidasa (PK) y una proteína de fusión de SHP1 de longitud completa citosólica con la mitad complementaria de b-galactosidasa (antígeno efector, AE). De esta manera, se midió la activación de PD-1 como función de la complementación de proteína quinasa (PQ)/antígeno efector (AE) debido al reclutamiento de SHP1 a PD1 fosforilado, lo que produce una b-galactosidasa funcional. Tras confirmar la expresión de PD-1, CD48 y CD3 en estas células, se diseñaron experimentos para evaluar el potencial de mAb contra CD48 para inducir la activación de PD-1 tras el entrecruzamiento (fig. 5). La activación de PD-1 no resultó inducida en ausencia de mAb PD-1 o un anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> secundario específico de Fc. El entrecruzamiento con el anticuerpo secundario indujo la activación de PD-1 en un factor de ~3; sin embargo, en la presencia de mAb de

CD48 o CD3, la activación de PD-1 se potenció en un factor de ~9, indicando que la estrecha asociación de CD48 o CD3 con PD-1 puede reforzar la activación de PD-1. El bajo nivel de activación de PD-1 inducido por el autoentrecruzamiento no resultó inesperado, ya que hay estudios que demuestran que una pequeña fracción de Lck está asociada constitutivamente a PD-1 en las células T (Sheppard et al., 2004).

*La activación de PD-1 dependiente de CD48 requiere actividad de la quinasa Src.* Con el fin de determinar si la potenciación de la activación/fosforilación de PD-1 por CD48 era dependiente de la actividad de la quinasa Src, se llevaron a cabo experimentos de entrecruzamiento en la presencia del inhibidor PP2 pan-quinasas Src, o el análogo inactivo PP3. La inhibición de la quinasa Src anuló la activación de PD-1 con el autoentrecruzamiento o co-entrecruzamiento con CD48, indicando que la actividad de Lck es necesaria para la activación de PD-1. Para validar adicionalmente este concepto, se evaluó la activación de PD-1 mediante entrecruzamiento de PD-1 con cantidades subóptimas de anti-PD-1 en presencia de anticuerpos contra CD71, un receptor que no migra hacia el interior de las balsas lipídicas o se asocia con las quinazas Src (Schatzmaier et al., 2015). El entrecruzamiento de PD-1 con CD71 no resultó en la activación de PD-1, apoyando el resultado que la traslocación de PD-1 a un medio rico en quinazas Src activadas permite la fosforilación y activación de PD-1.

*La activación de PD-1 dependiente de CD48 dificulta la proliferación inducida por AR de las células T humanas primarias.* Con el fin de evaluar funcionalmente la capacidad de la activación de PD-1 dependiente de CD48 de modular las funciones de las células T, se correcurrieron perlas magnéticas covalentemente con CD48, mAb de PD-1 y control de isotipo, y se sometieron a ensayo en células T humanas primarias (CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) estimuladas con anti-CD3 unido a placa. En primer lugar, los presentes inventores confirmaron la expresión de CD48 y PD-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos preactivados. Con el fin de evaluar el efecto de las perlas recubiertas sobre la activación celular, se marcaron células pan-T humanas con violeta CellTrace y después se activaron con mAb de CD3, y se analizó la proliferación celular mediante dilución de CellTrace (fig. 6). Tal como se muestra en la figura 6, las perlas correcurrieras con mAb tanto de CD48 como de PD-1 fueron capaces de reducir significativamente la proliferación de las células T respecto a las células tratadas con perlas recubiertas con mAb de CD48 o de PD-1 por sí solos, y el efecto inhibitorio fue más significativo en células CD4<sup>+</sup> que en CD8<sup>+</sup>. Como control adicional, los presentes inventores también sometieron a ensayo perlas correcurrieras con mAb de PD-1 y de CD11a; en donde las últimas se seleccionaron bajo la premisa de que CD11a no es una proteína residente constitutivamente en balsas lipídicas. Tal como se esperaba, PD-1 no presentaba ninguna función inhibitoria tras el correclutamiento con CD11a. Estos resultados confirman adicionalmente la hipótesis de que la activación de PD-1 por moléculas residentes en balsas lipídicas (es decir, CD48) puede activar eficazmente PD-1 para inhibir la expansión de las células T.

*Un anticuerpo biespecífico contra PD-1 y CD48 induce la activación de PD-1 modulando la secreción de citoquinas y la activación de NFAT en células T humanas estimuladas por AR.* Los resultados obtenidos utilizando perlas recubiertas con anticuerpo monoclonal separadas, llevó a los presentes inventores a generar anticuerpos biespecíficos (BsAb) con el fin de someter a ensayo la hipótesis de que la localización molecular de PD-1 con CD48 proporcionaría una señal inhibitoria de las células T humanas activadas (fig. 7). Se generaron anticuerpos publicados (anticuerpo anti-PD-1 agonista de la solicitud de patente n.º WO 2011/110621A1), y anticuerpo anti-CD48 del documento n.º US2012/0076790), y se diseñaron algunos BsAb como constructos de botón u ojal de cadena pesada/ligera única a fin de generar BsAb que contenían anti-PD-1 y anti-CD48 (PD-1/CD48), o anti-PD-1 y anti-TNP como control (PD-1/ISO) (fig. 7A). Se demostró la unión de cada brazo a PD-1 o CD48 mediante citometría de flujo en células Jurkat sobreexpresantes de PD-1 con el fin de detectar la unión tanto de PD-1 como CD48, o que carecían de la expresión de PD-1, a fin de detectar únicamente la unión de CD48 (fig. 7B). Utilizando el sistema de ensayo de complementación de PD-1 en Jurkat descrito anteriormente, los presentes inventores demostraron que los BsAb PD-1/CD48 eran ~3 veces más potentes induciendo la activación de PD-1 que el control PD-1/ISO, confirmando que la colocalización PD-1/CD48 utilizando dicho formato de BsAb resulta también en una fosforilación potenciada de PD-1 (fig. 6). Con el fin de evaluar el efecto funcional de los BsAb PD-1/CD48, se estimularon células T CD4<sup>+</sup> de memoria humanas (PD1<sup>+</sup>) con anti-CD3e unido a placa en presencia de BsAb PD-1/CD48 unido a placa o anticuerpos de control, y se analizaron para la secreción de citoquinas (fig. 7C). Dicho análisis reveló un efecto inmunomodulador del BsAb PD-1/CD48, ya que redujo significativamente la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-2, aunque potenció la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Debido a que la secreción de IL-2 requiere la activación transcripcional de NFAT (Chow et al., 1999), se evaluó el efecto del BsAb PD-1/CD48 sobre la activación de NFAT en células T Jurkat que expresaban tanto PD-1 como un informador NFAT-luciferasa, y se activó con anti-CD3e en presencia de células THP-1 para la coestimulación. Este análisis mostró que los BsAb PD-1/CD48 eran capaces de reducir el informador NFAT >10-30 % que los anticuerpos de control, e indica que la activación dependiente de CD48 de PD-1 también inhibe un suceso transcripcional clave de las células T efectoras que conduce a la producción de IL-2.

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
  - 5 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 73 (H-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 78 (H-CDR2) y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 77 (H-CDR3), y
  - 10 una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 165 (L-CDR1; la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 166 (L-CDR2), y la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 32 (L-CDR3).
2. Anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo monoclonal, un Fab, un F(ab')<sub>2</sub>, un Fv y un scFv.
3. Anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que presenta una identidad de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ NO: 135, y una región variable de cadena ligera que presenta una identidad de por lo menos 90 % respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ NO: 127.
4. Anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 y SEQ ID NO: 127, respectivamente.
5. Anticuerpo anti-PD1 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho anticuerpo comprende:
  - 30 una región constante de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: regiones constantes de IgG4, IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA e IgE, preferentemente en las que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de una IgG4 con una mutación Ser228Pro o en el que la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de una IgG1 con las mutaciones Leu234Ala y Leu235Ala.
6. Anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en kappa y lambda.
7. Anticuerpo anti-PD-1 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 149 y SEQ ID NO: 145, respectivamente.
8. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. Anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la utilización como un medicamento, preferentemente para la utilización en el tratamiento de un trastorno de la ruta de PD-1.
10. Anticuerpo anti-PD1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización según la reivindicación 9, en el que el trastorno de la ruta de PD-1 es una enfermedad inflamatoria crónica o una enfermedad inflamatoria aguda.
11. Anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización según la reivindicación 9 o 10, en el que el trastorno de la ruta de PD-1 se selecciona del grupo que consiste en: artritis, artritis reumatoide, asma, EPOC, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, soriasis, artritis soriásica, vasculitis, adhesiones quirúrgicas, ictus, diabetes de tipo I, enfermedad de Lyme, meningoencefalitis, uveítis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, lupus, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Guillain-Barré, dermatitis atópica, hepatitis autoinmunitaria, alveolitis fibrosante, enfermedad de Grave, nefropatía de IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Ménière, pénfigo, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, escleroderma, granulomatosis de Wegener, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo, cirugía, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo del trasplante, enfermedad cardíaca, incluyendo enfermedades isquémicas, tales como el infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, osteoporosis, osteoartritis, periodontitis e hipocloridia, infertilidad relacionada

con la falta de tolerancia fetomaterna, síndrome de Sjögren, vitíligo, miastenia grave y esclerosis sistémica, y/o

en el que el trastorno de la ruta de PD-1 se selecciona del grupo que consiste en: esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico, polimiositis, arteritis de células gigantes, soriasis, artritis soriásica, espondilitis anquilosante y enfermedad intestinal inflamatoria.

5  
12. Anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra por una vía parenteral, vía intravenosa o vía subcutánea.

10  
13. Polinucleótido aislado codificante de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

15  
14. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 13.

15  
15. Célula huésped que comprende un vector de expresión según la reivindicación 14, preferentemente en la que la célula es una célula de mamífero.

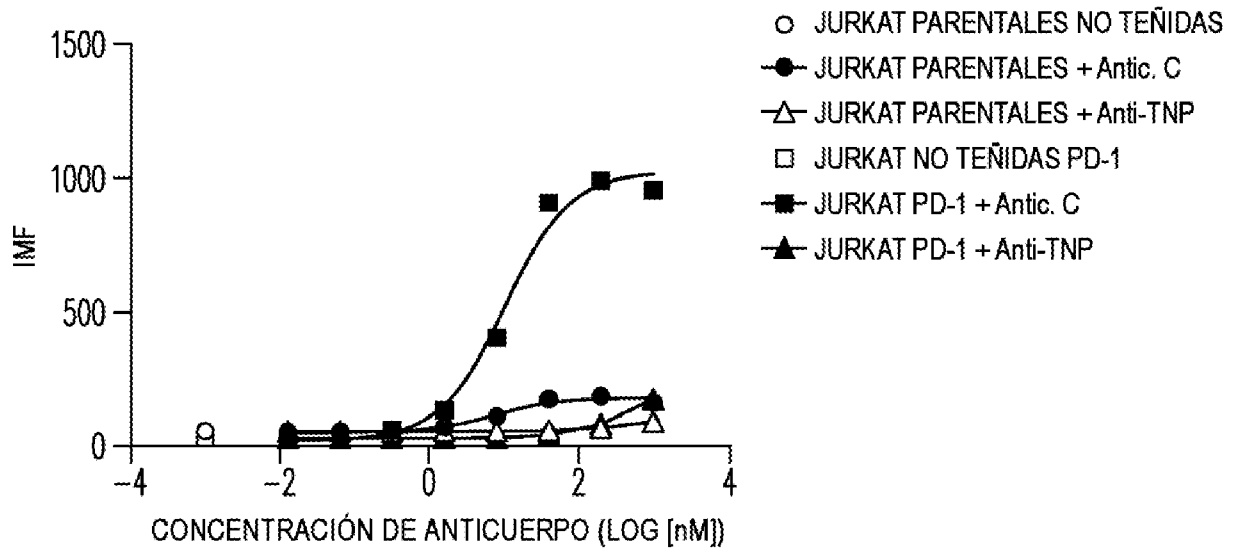
20  
16. Método de fabricación de un anticuerpo, que comprende las etapas de:

- cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de una región variable de cadena pesada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de la región variable de cadena ligera respectiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, preferentemente un vector de expresión que
- 25  
comprende un polinucleótido codificante de una cadena pesada según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 y un vector de expresión que comprende un polinucleótido codificante de una cadena ligera según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, bajo condiciones que permiten la formación de un anticuerpo, y
- recuperar dicho anticuerpo,

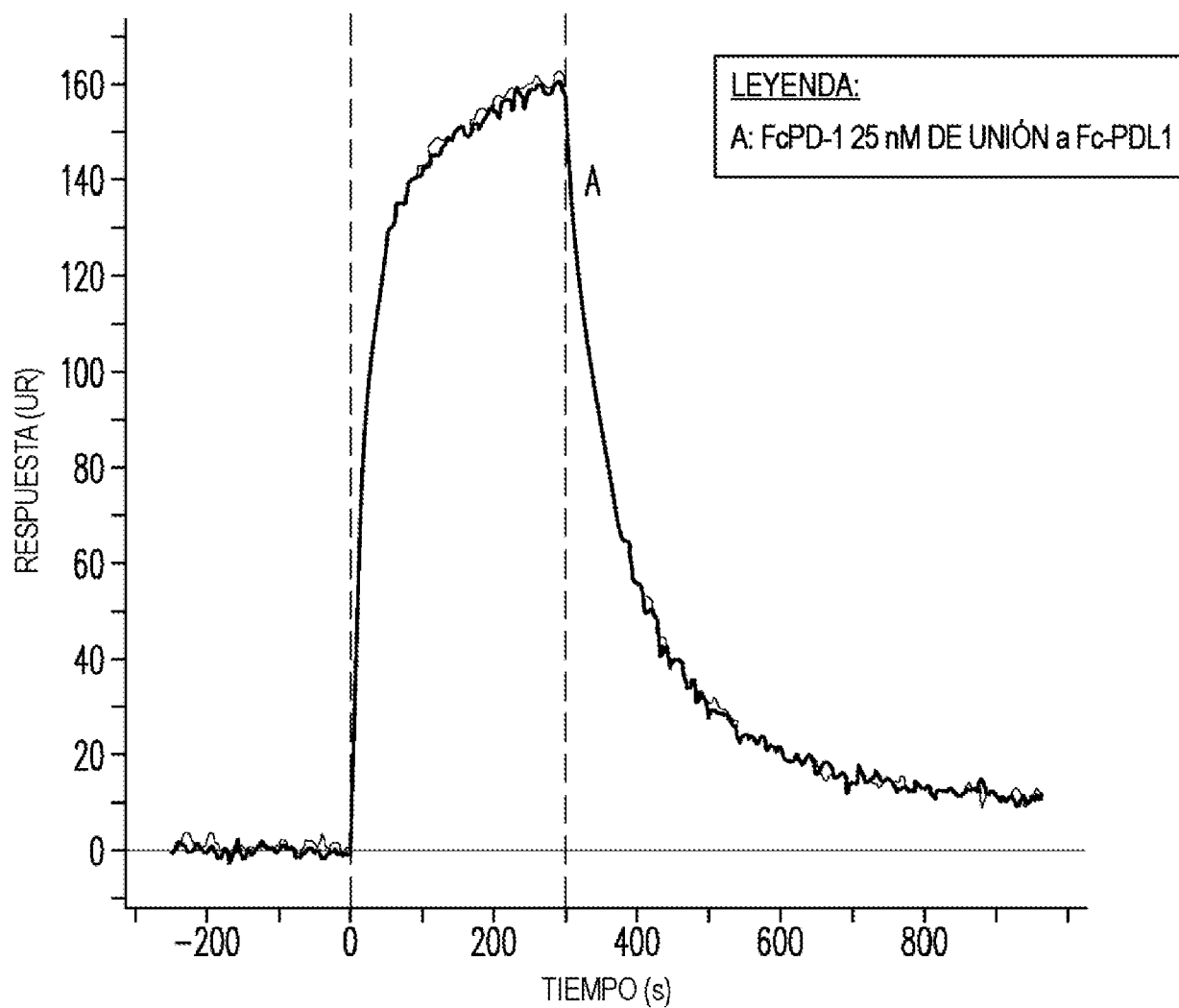
30  
opcionalmente en el que el método comprende, además, la etapa de purificar dicho anticuerpo y/o la etapa de formular dicho anticuerpo en una composición farmacéutica.

35  
17. Anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno de anti-PD-1 agonista y un segundo sitio de unión a antígeno, en el que dicho primer sitio de unión a antígeno de anti-PD-1 agonista comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

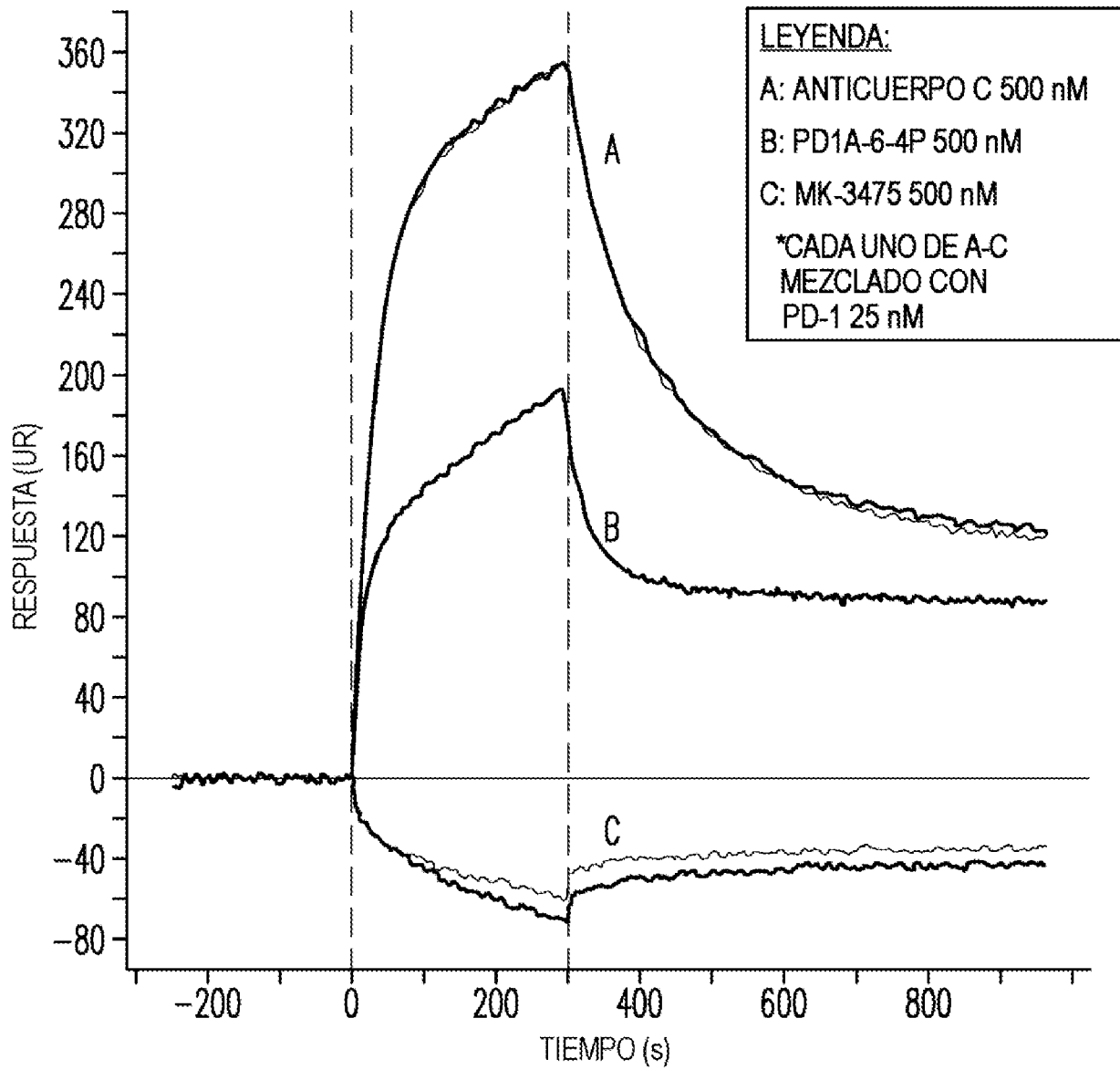
40  
18. Anticuerpo multiespecífico según la reivindicación 17, en el que dicho segundo sitio de unión a antígeno es un sitio de unión de anti-CD48, un sitio de unión de anti-CD2, un sitio de unión de anti-CD11a o un sitio de unión de anti-CD3 y/o en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.



**FIG. 1**



**FIG. 2A**

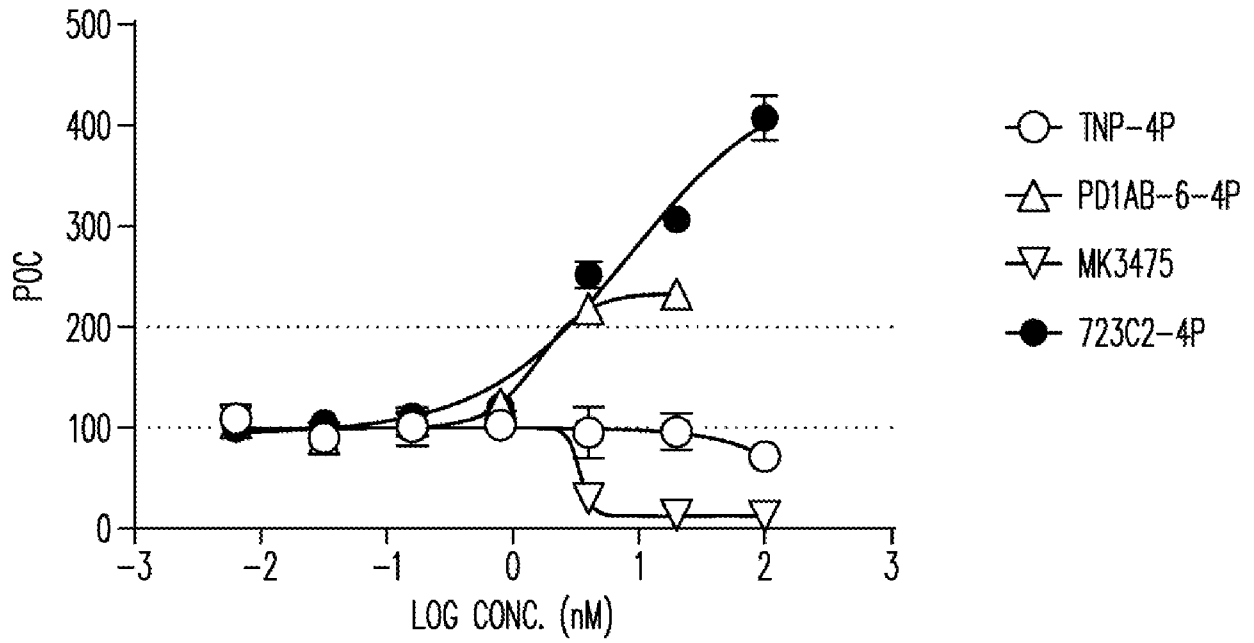


**FIG. 2B**

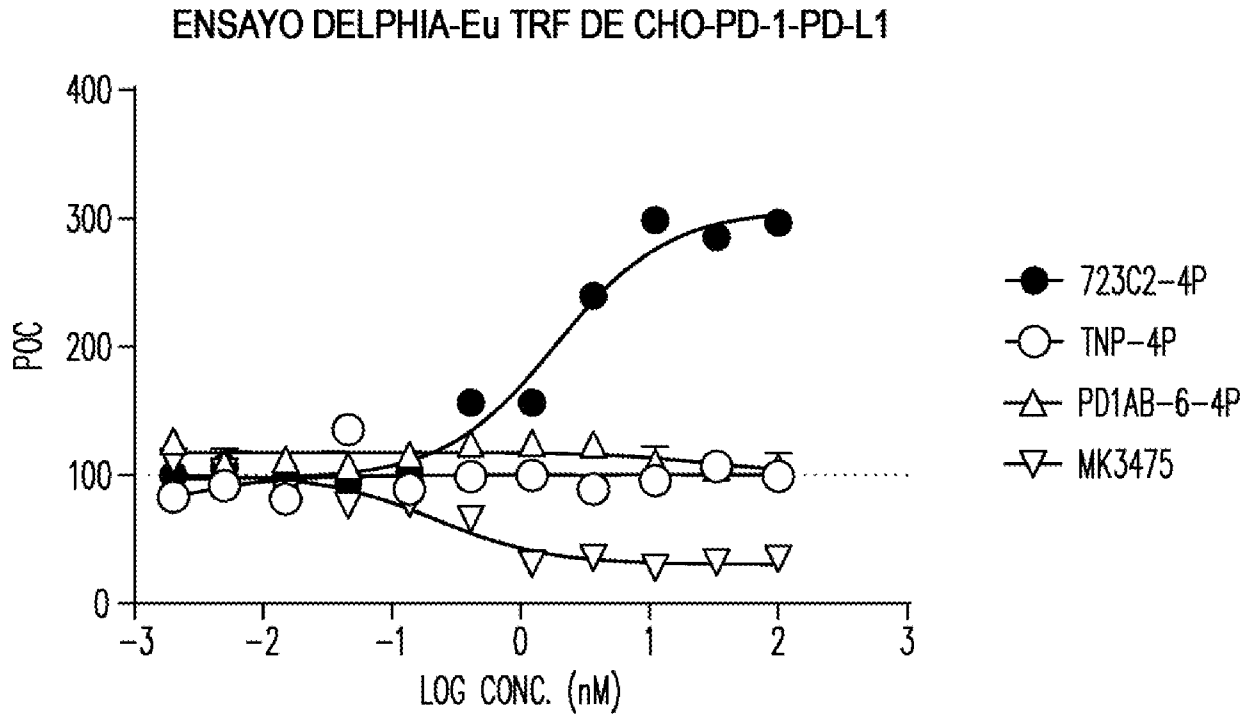
PD1BIOTINA: ENSAYO DE INTERACCIÓN DE PD-L1

RECUBRIMIENTO PD-L1 (2 µg/ml) (100 ng)

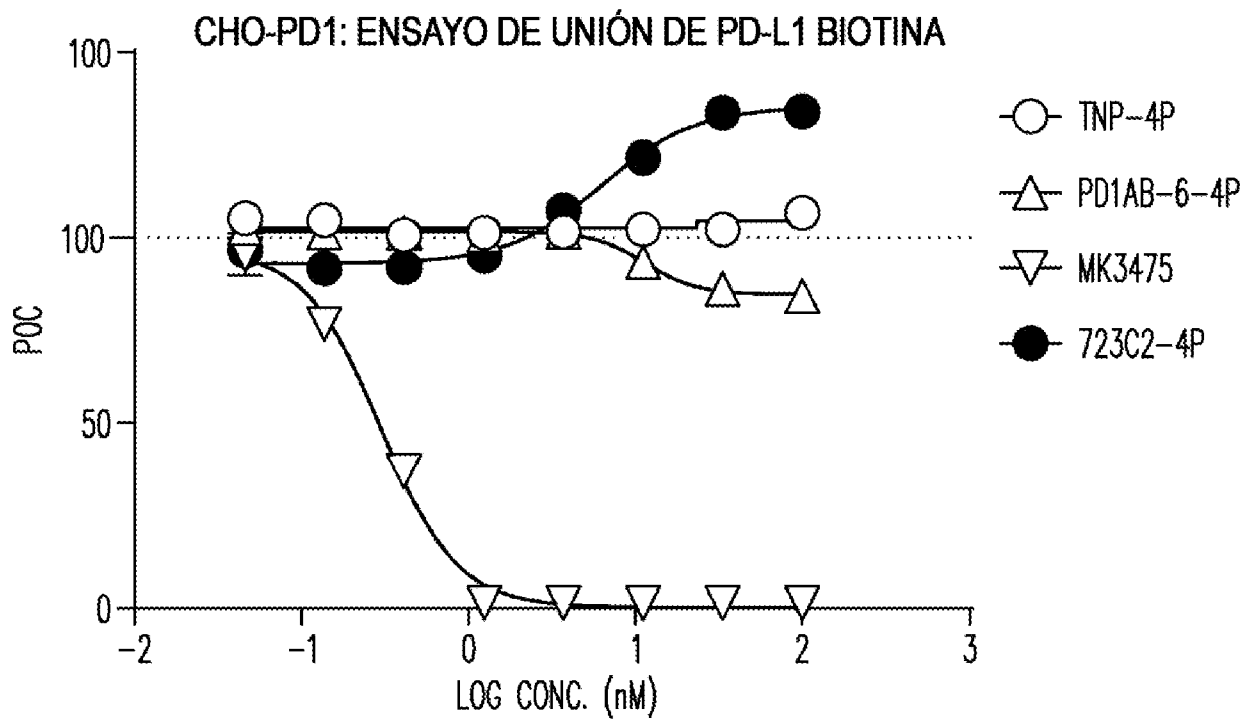
PD-1 BIOTINA: (0,5 ng/µl, 10 ng/20 µl)



**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIG. 3C**

ENSAYO DELPHIA-Eu TRF DE CHO-PD1-PDL1

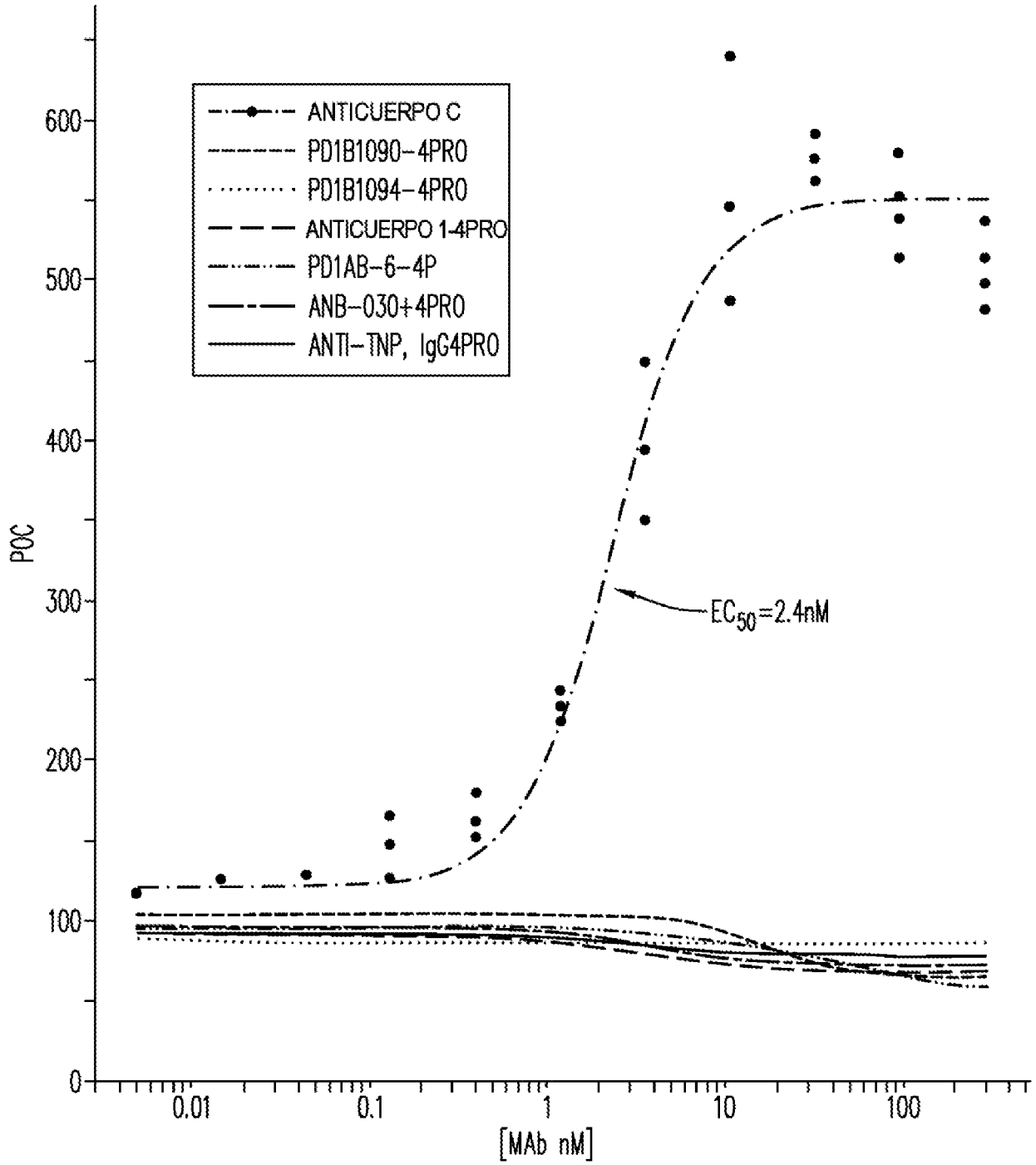
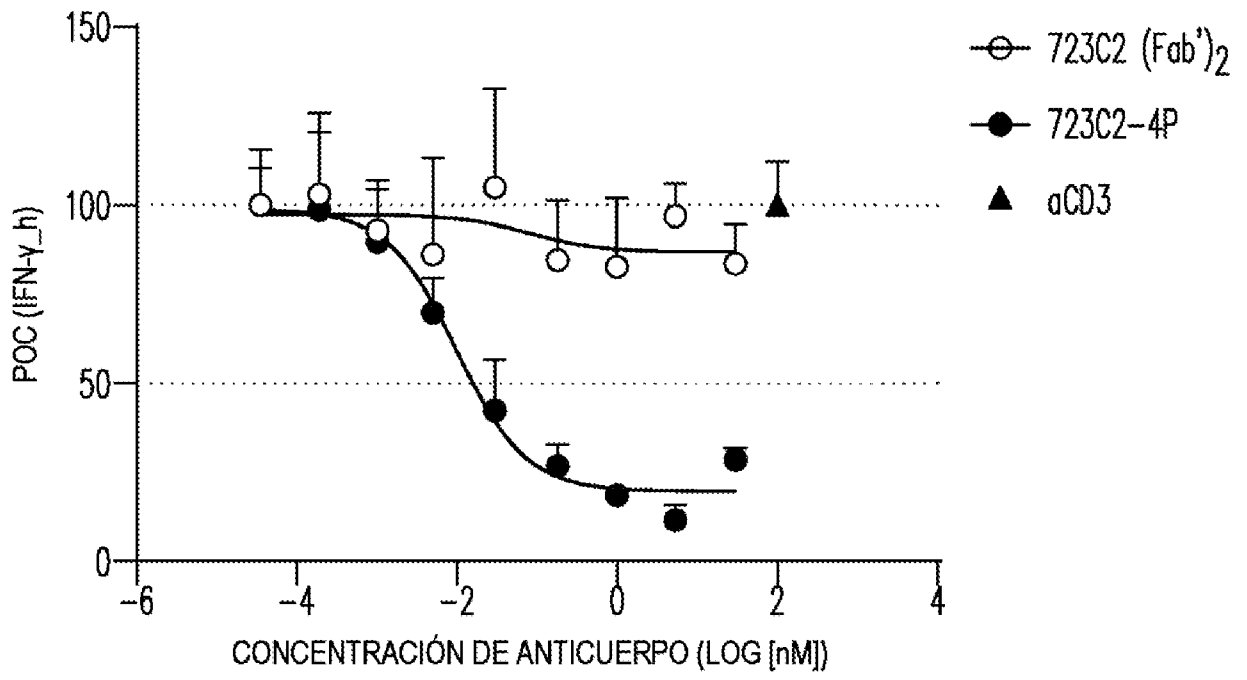
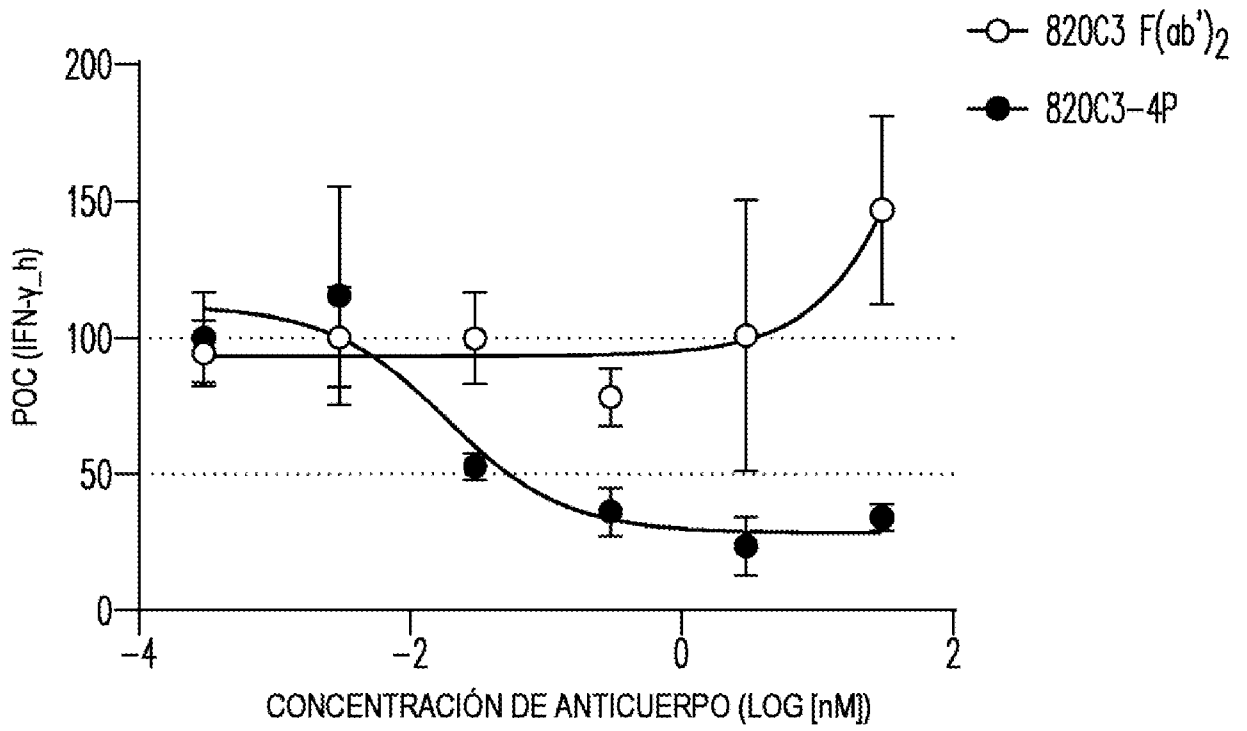


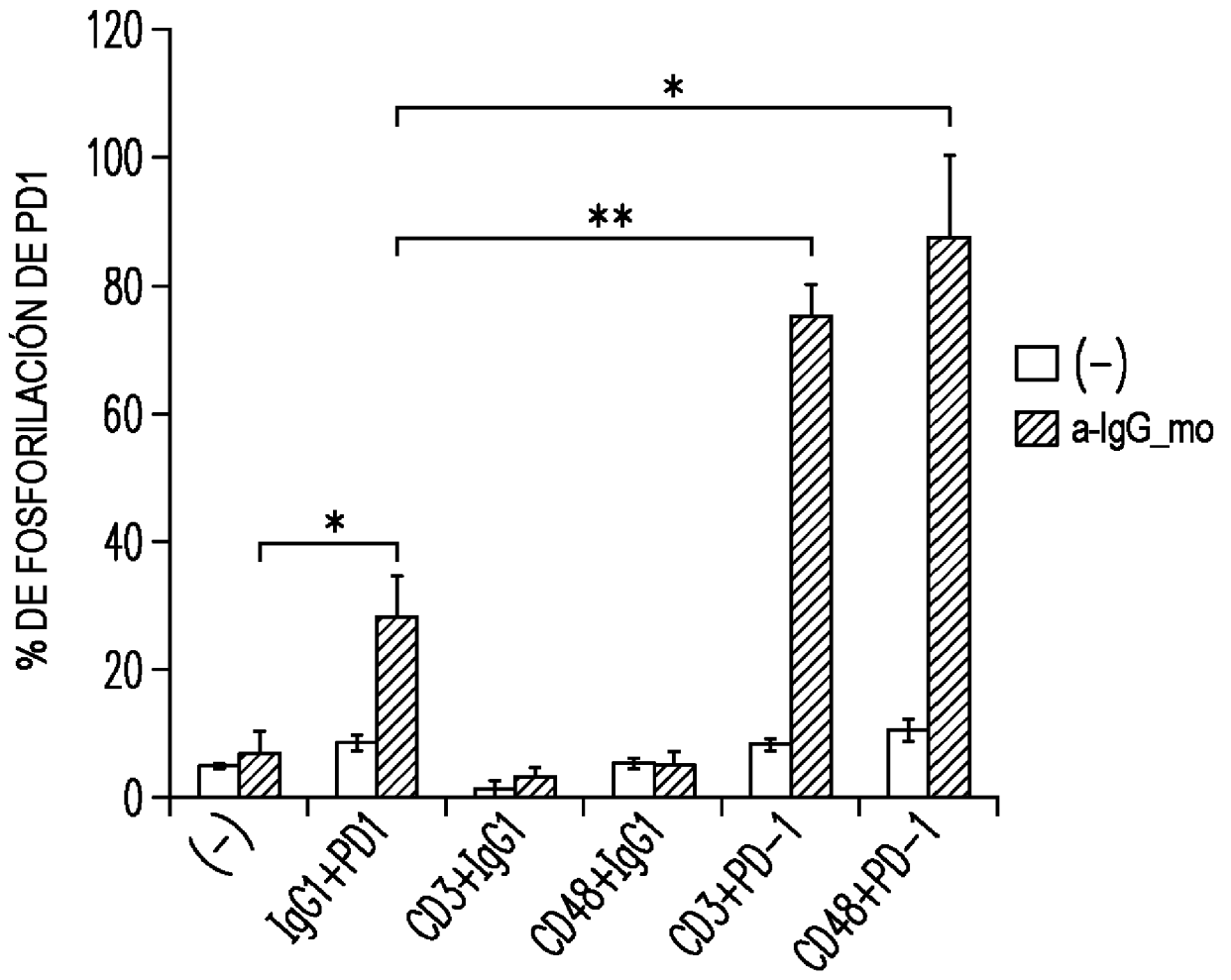
FIG. 3D



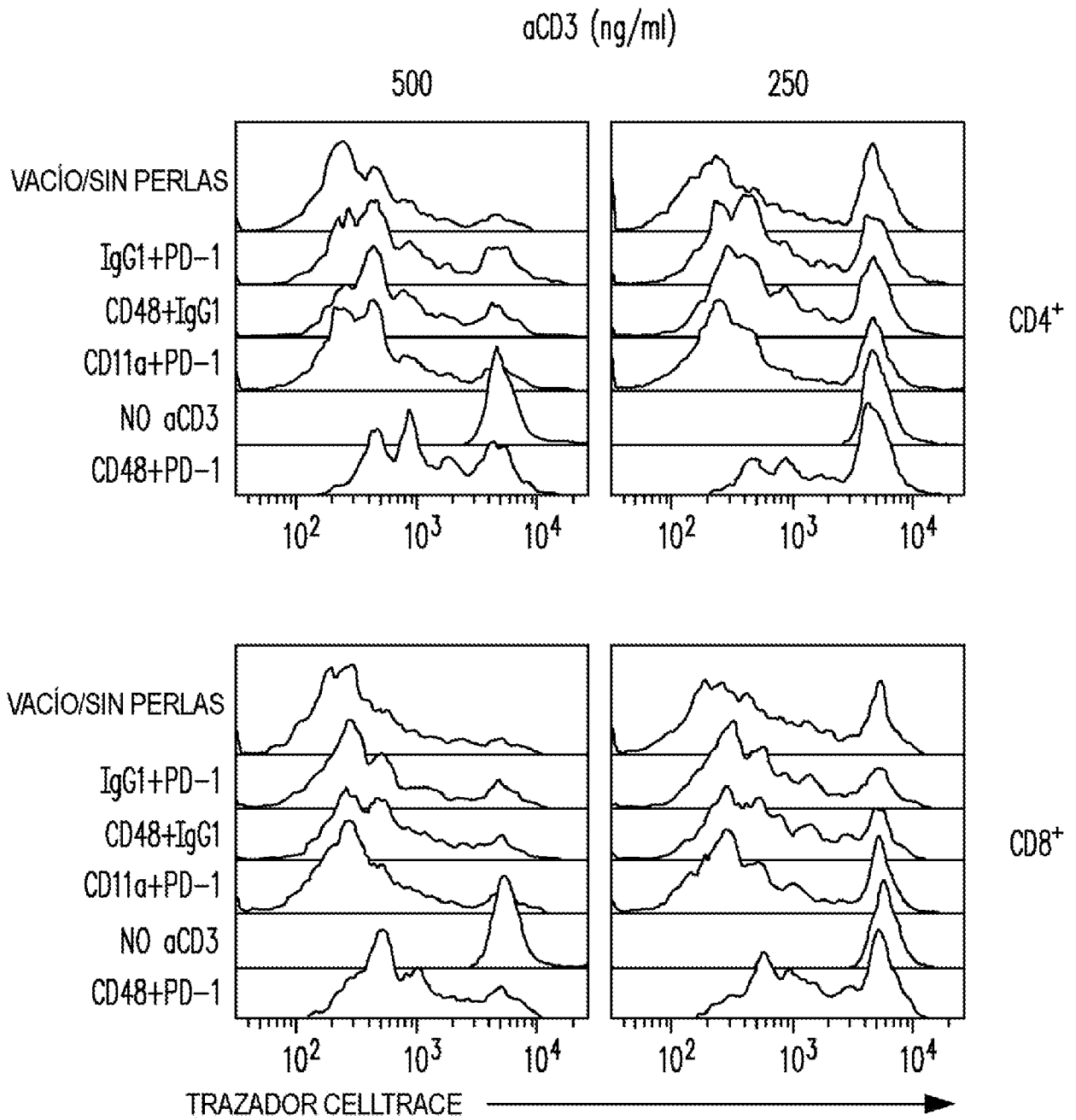
**FIG. 4A**



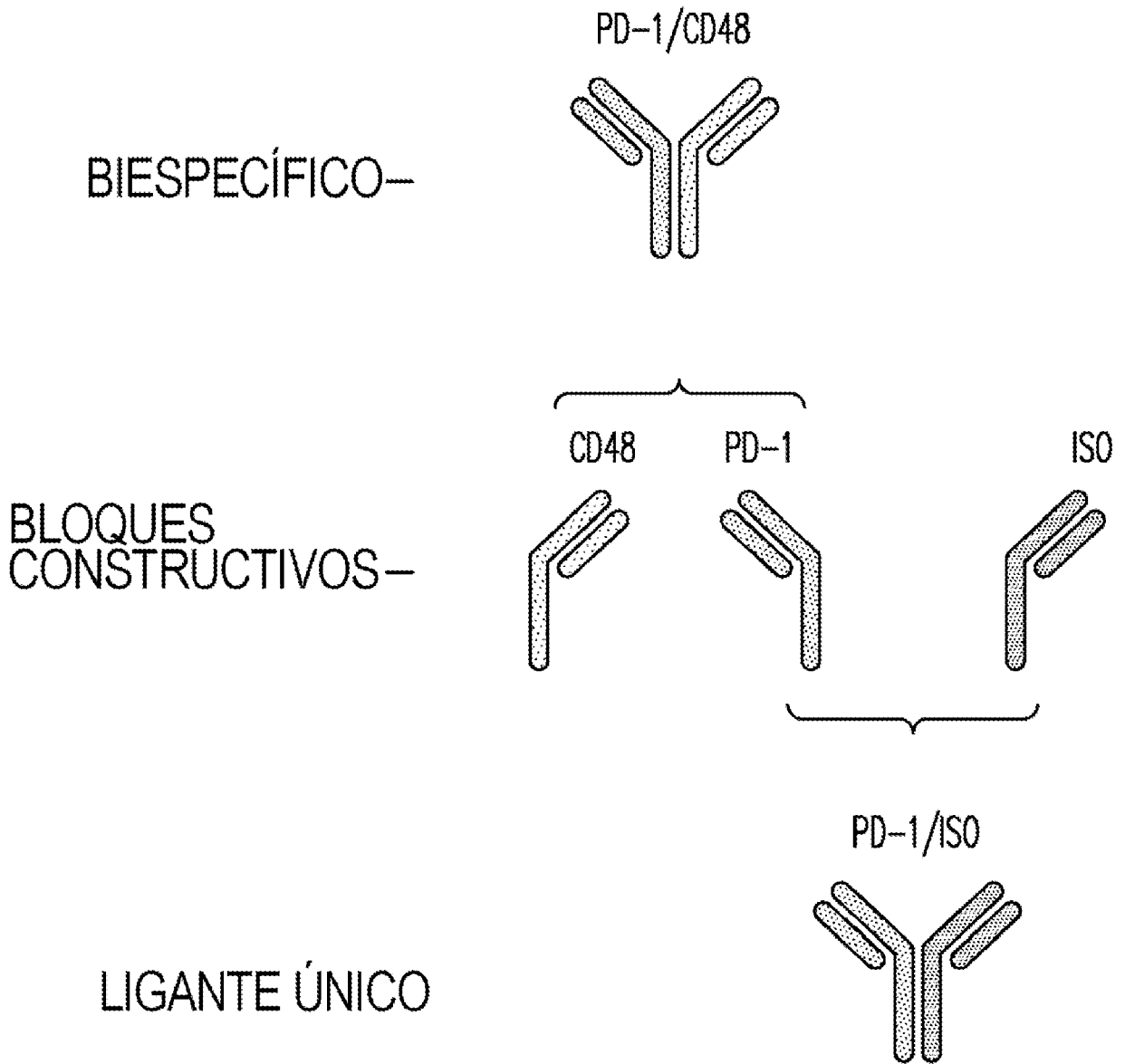
**FIG. 4B**



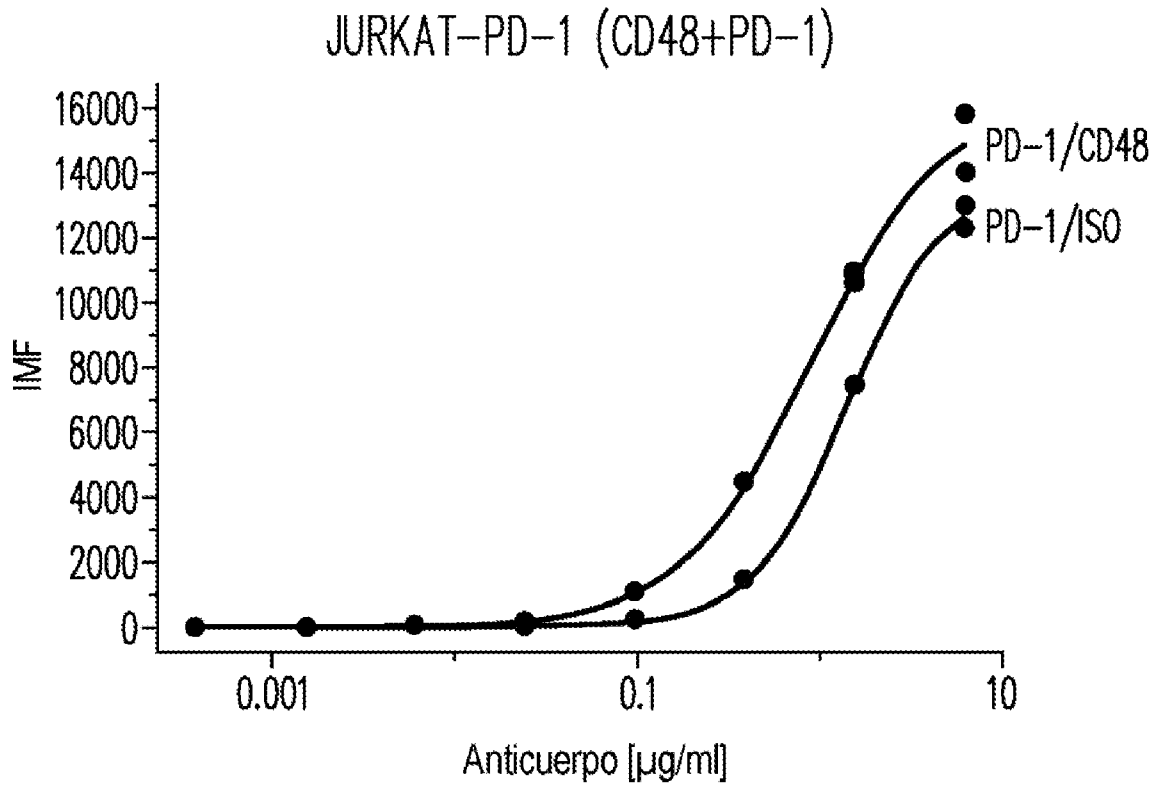
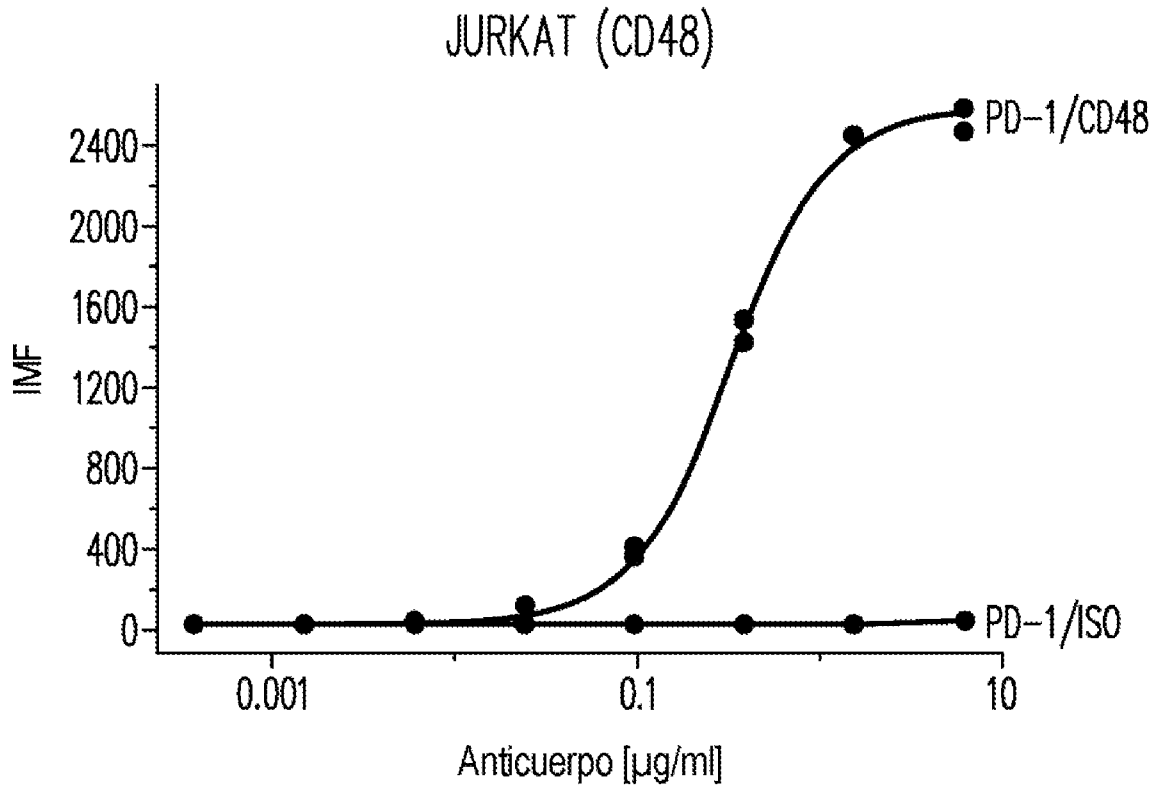
**FIG. 5**



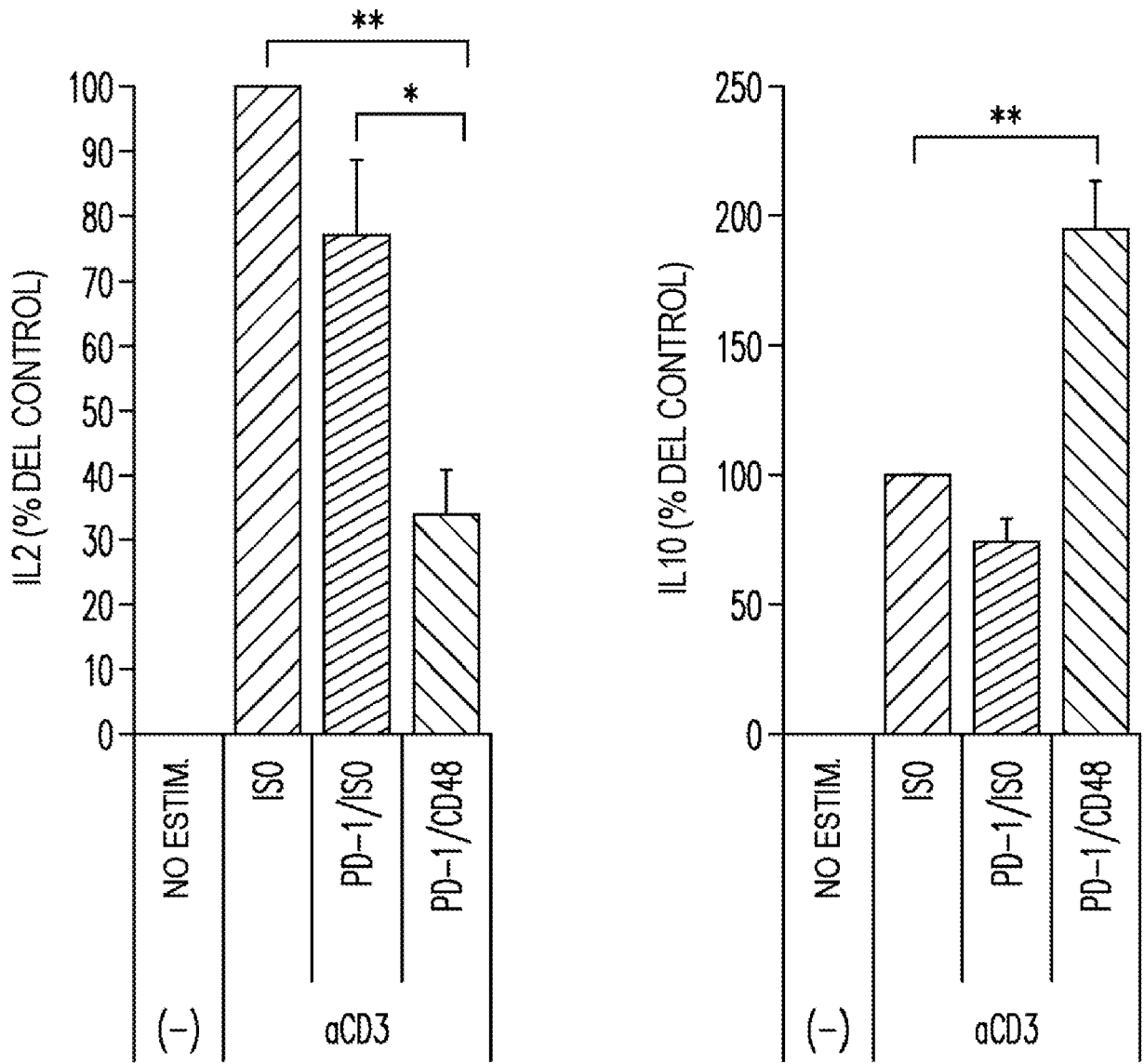
**FIG. 6**



**FIG. 7A**



**FIG. 7B**



**FIG. 7C**