

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 958**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2016** **E 18199685 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021** **EP 3456346**

54 Título: **Moléculas de unión a PD-1 y LAG-3 y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

30.07.2015 US 201562198867 P

09.10.2015 US 201562239559 P

13.11.2015 US 201562255140 P

15.04.2016 US 201662322974 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
09.03.2022

73 Titular/es:

MACROGENICS, INC. (100.0%)

9704 Medical Center Drive

Rockville, MD 20850, US

72 Inventor/es:

SHAH, KALPANA;

SMITH, DOUGLAS H.;

LA MOTTE-MOHS, ROSS;

JOHNSON, LESLIE S.;

MOORE, PAUL A.;

BONVINI, EZIO y

KOENIG, SCOTT

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 898 958 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

Moléculas de unión a PD-1 y LAG-3 y métodos de uso de las mismas

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° de serie 62/198.867 (presentada el 30 de julio de 2015; pendiente), 62/239.559 (presentada el 9 de octubre de 2015; pendiente), 62/255.140 (presentada el 13 de noviembre de 2015; pendiente), y 62/322.974 (presentada el 15 de abril de 2016; pendiente).

Referencia al listado de secuencias

Esta solicitud incluye uno o más listados de secuencias de conformidad con 37 CFR 1.821 et seq., que se divulgan en medios legibles por ordenador (nombre de archivo: 1301_0122PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, creado el 1 de julio de 2016 y con un tamaño de 282.789 bytes).

Campo de la divulgación

La presente divulgación está dirigida a moléculas de unión a PD-1 que comprenden el dominio de unión a PD-1 de anticuerpos anti-PD-1 seleccionados capaces de unirse tanto a PD-1 de mono cynomolgus como a PD-1 humana: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15. La divulgación se refiere particularmente a las moléculas de unión a PD-1 que son versiones humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos, o que comprenden fragmentos de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 (especialmente inmunocongugados, diacuerpos, BiTE, anticuerpos biespecíficos, etc.). La divulgación se refiere particularmente a las moléculas de unión a PD-1 que, además, son capaces de unirse a un epítipo de una molécula implicada en la regulación de un punto de control inmunológico que está presente en la superficie de una célula inmunitaria. La presente divulgación también se refiere a métodos de uso de tales moléculas de unión a PD-1 para detectar PD-1 o para estimular una respuesta inmunitaria. La presente divulgación también se refiere a métodos de terapia de combinación en los que una molécula de unión a PD-1 que comprende uno o más dominios de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 seleccionados se administra en combinación con una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria y/o en combinación con una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno de cáncer.

Antecedentes de la invención

I. Respuestas inmunitarias mediadas por células

El sistema inmunitario de los humanos y otros mamíferos es responsable de proporcionar protección contra infecciones y enfermedades. Tal protección es proporcionada tanto por una respuesta inmunitaria humoral como por una respuesta inmunitaria mediada por células. La respuesta humoral da como resultado la producción de anticuerpos y otras biomoléculas que son capaces de reconocer y neutralizar objetivos extraños (antígenos). Por el contrario, la respuesta inmunitaria mediada por células implica la activación de macrófagos, células asesinas naturales (NK) y linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno por las células T, y la liberación de varias citoquinas en respuesta al reconocimiento de un antígeno (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1): 39-48).

La capacidad de las células T para mediar de manera óptima una respuesta inmunitaria contra un antígeno requiere dos interacciones de señalización distintas (Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating CoStimulation", Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "CheckpointBlockade in Cancer Immunotherapy", Adv. Immunol. 90:297-339). En primer lugar, el antígeno que se ha dispuesto en la superficie de las células presentadoras de antígeno (**APC**) debe presentarse a una célula T CD4⁺ T virgen específica de antígeno. Dicha presentación suministra una señal a través del receptor de células T (**TCR**) que dirige a la célula T para iniciar una respuesta inmunitaria que será específica para el antígeno presentado. En segundo lugar, una serie de señales coestimuladoras e inhibitoras, mediadas a través de interacciones entre las APC y distintas moléculas de superficie de las células T, desencadenan primero la activación y proliferación de las células T y, en última instancia, su inhibición. Así, la primera señal confiere especificidad a la respuesta inmunitaria mientras que la segunda señal sirve para determinar la naturaleza, magnitud y duración de la respuesta.

El sistema inmunitario está estrictamente controlado por ligandos y receptores coestimuladores y coinhibidores. Estas moléculas proporcionan la segunda señal para la activación de las células T y proporcionan una red equilibrada de señales positivas y negativas para maximizar las respuestas inmunitarias contra la infección a la vez que limitan la inmunidad uno mismo (Wang, L. et al. (7 de marzo de 2011) " VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses," J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16;

Lepenie, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections," *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288). Es de particular importancia la unión entre los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de la célula presentadora de antígeno y los receptores de CD28 y CTLA-4 del linfocito T CD4+ (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," *Immunol. Rev.* 229:307-321). La unión de B7.1 o de B7.2 a CD28 estimula la activación de las células T; la unión de B7.1 o B7.2 a CTLA-4 inhibe dicha activación (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," *Immunol. Rev.* 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548). CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de las células T (Gross, J., et al. (1992) "Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse," *J. Immunol.* 149:380-388), mientras que la expresión de CTLA-4 se regula rápidamente por incremento después de la activación de las células T (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement," *Immunity* 4:535-543). Como CTLA-4 es el receptor de mayor afinidad (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126), la unión inicia en primer lugar la proliferación de células T (a través de CD28) y luego la inhibe (a través de la expresión naciente de CTLA-4), amortiguando de este modo el efecto cuando la proliferación ya no es necesaria.

Investigaciones adicionales sobre los ligandos del receptor CD28 han llevado a la identificación y caracterización de un conjunto de moléculas B7 relacionadas (la "Superfamilia B7") Coyle, A.J. et al. (2001) "The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T-Cell Function," *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells," *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance," *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) "CD28/B7 System of T-Cell Costimulation," *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses," *Microbes Infect.* 6:759-766). Actualmente hay varios miembros conocidos de la familia: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), el ligando coestimulador inducible (ICOS-L), el ligando 1 de muerte programada (PD-L1; B7-H1), el ligando 2 de muerte programada (PD-L2; B7-DC), B7-H3, B7-H4 y B7-H6 (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Flajnik, M.F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC," *Immunogenetics* epub doi.org/10.1007/s00251-012-0616-2).

II. Muerte programada-1 ("PD-1")

La muerte programada-1 ("PD-1", también conocida como "CD279") es una proteína de membrana de tipo I de aproximadamente 31 kD miembro de la familia extendida de reguladores de células T CD28/CTLA-4 que regula de manera generalizada las respuestas inmunitarias (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895; Publicación de solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; Patentes de Estados Unidos N° 6.808.710; 7.101.550; 7.488.802; 7.635.757; 7.722.868; Publicación de PCT N° WO 01/14557).

PD-1 se expresa en células T activadas, células B y monocitos (Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," *Int. Immunol.* 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al. (2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC," *J. Immunol.* 169:5538-5545) y en niveles bajos en células T asesinas naturales (NK) ((Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice," *J. Exp. Med.* 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298).

La región extracelular de PD-1 consiste de un único dominio V de inmunoglobulina (Ig) con un 23% de identidad con el dominio equivalente en CTLA-4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). El dominio de IgV extracelular va seguido de una región transmembrana y una cola intracelular. La cola intracelular contiene dos sitios de fosforilación localizados en un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina y un motivo conmutador inmunorreceptor basado en tirosina, lo que sugiere que PD-1 regula negativamente las señales de TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. et al. (2006) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To TCell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer," *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745).

PD-1 media su inhibición del sistema inmunitario uniéndose a B7-H1 y B7-DC (Flies, DB et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity", *J. Immunother.* 30 (3): 251-260; Patentes de Estados Unidos N° 6.803.192; 7.794.710; Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; Publicaciones de PCT N° WO 01/39722; WO 02/086083).

B7-H1 y B7-DC se expresan ampliamente en las superficies de tejidos humanos y murinos, como corazón, placenta, músculo, hígado fetal, bazo, ganglios linfáticos y timo, así como hígado, pulmón, riñón, células de islotes del páncreas y el intestino delgado murinos (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). En humanos, se ha descubierto expresión de la proteína B7-H1 en células endoteliales humanas (Chen, Y. et al. (2005) "Expression of B7 H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells," *Nephron. Exp. Nephrol.* 102:e81-e92; de Haij, S. et al. (2005) "Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1" *Kidney Int.* 68:2091-2102; Mazanet, M.M. et al. (2002) "B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis," *J. Immunol.* 169:3581-3588), miocardio (Brown, J.A. et al. (2003) "Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production," *J. Immunol.* 170:1257-1266), sincitiotrofoblastos (Petroff, M.G. et al. (2002) "B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface," *Placenta* 23:S95-S101). Las moléculas también se expresan por macrófagos residentes de algunos tejidos, por macrófagos que han sido activados con interferón (IFN)- γ o factor de necrosis tumoral (TNF)- α (Lachman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation," *Nat. Immunol.* 2:261-268), y en tumores (Dong, H. (2003) "B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity", *J. Mol. Med.* 81: 281-287).

Se ha descubierto que la interacción entre B7-H1 y PD-1 proporciona una señal coestimuladora negativa crucial para las células T y B (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity", *Semin. Cancer Biol.* 17(4): 288-298) y funciona como un inductor de muerte celular (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programme Cell Death", *EMBO J.* 11: 3887-3895; Subudhi, SK et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition", *J. Molec. Med.* 83:193-202). Más específicamente, se ha descubierto que la interacción entre bajas concentraciones del receptor PD-1 y el ligando B7-H1 da como resultado la transmisión de una señal inhibitoria que inhibe fuertemente la proliferación de células T CD8⁺ específicas de antígeno; a concentraciones más altas, las interacciones con PD-1 no inhiben la proliferación de células T pero reducen notablemente la producción de múltiples citoquinas (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126). Se ha descubierto que la proliferación de células T y la producción de citoquinas por las células T CD4 y CD8 tanto en reposo como previamente activadas, e incluso las células T vírgenes de sangre del cordón umbilical, son inhibidas por las proteínas de fusión B7-H1-Fc solubles (Freeman, G.J. et al. (2000) "Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation," *J. Exp. Med.* 192:1-9; Lachman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation," *Nature Immunol.* 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2," *Eur. J. Immunol.* 32(3):634-643; Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126).

El papel de B7-H1 y PD-1 en la inhibición de la activación y proliferación de células T ha sugerido que estas biomoléculas podrían servir como objetivos terapéuticos para tratamientos de inflamación y cáncer. Por tanto, se ha propuesto el uso de anticuerpos anti-PD-1 para tratar infecciones y tumores y modular de manera positiva una respuesta inmunitaria adaptativa (ver, Publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; Patentes de Estados Unidos N° 7.521.051; 7.563.869; 7.595.048; Publicaciones de PCT N° WO 2004/056875; WO 2008/083174). Se ha informado de anticuerpos capaces de unirse específicamente a PD-1 por Agata, T. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," *Int. Immunol.* 8(5):765-772; y Berger, R. et al. (2008) "Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies," *Clin. Cancer Res.* 14(10):3044-3051 (ver también, Patentes de Estados Unidos N° 8,008,449 y 8.552.154; Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 y 2014/0044738; y Publicaciones de Patente de PCT N° WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549; y WO 2013/014668).

Sin embargo, a pesar de todos estos avances anteriores, sigue habiendo una necesidad de composiciones mejoradas capaces de dirigir más vigorosamente el sistema inmunitario del cuerpo para que ataque las células cancerosas o las células infectadas por patógenos, especialmente a concentraciones terapéuticas más bajas. Porque aunque el sistema inmunitario adaptativo puede ser un potente mecanismo de defensa contra el cáncer y la enfermedad, a menudo se ve obstaculizado por mecanismos inmunosupresores en el microambiente tumoral, como la expresión de PD-1. Además, las moléculas coinhibidoras expresadas por células tumorales, células inmunitarias y células estromales en el medio tumoral pueden atenuar de manera dominante las respuestas de las células T contra las células cancerosas. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de moléculas de unión a PD-1 potentes. En particular, hay una necesidad de moléculas de unión a PD-1 potentes que tengan un perfil cinético de unión deseable y que antagonicen el eje PD-1/PD-L1 bloqueando la interacción PD-1/PD-L1, lo que podría proporcionar un

valor terapéutico mejorado a los pacientes que padecen de cáncer u otras enfermedades y afecciones. La presente divulgación está dirigida a estos y otros objetivos.

La WO 2014194302 se refiere a composiciones y métodos relacionados con o derivados de anticuerpos anti-PD-1.

La WO 2014179664 se refiere a un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina aislado y un polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina aislado que se unen a una proteína de muerte programada-1 (PD-1).

Sumario de la invención

La presente invención está dirigida a una molécula de unión a PD-1 antihumana multiespecífica que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable, en donde dicho dominio de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 147, y dicho dominio de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 153. La invención también está dirigida a una composición que comprende la molécula de unión multiespecífica anti-PD-1 humana de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La invención también está dirigida a la molécula de unión a PD-1 antihumana multiespecífica, o composición de la invención para su uso en (A) un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T de un sujeto con necesidad de ello o (B) el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un sistema inmunitario deprimido. La invención también se dirige al uso de la molécula de unión multiespecífica anti-PD-1 humana de la invención en la detección *in vitro* de PD-1, en donde dicha molécula o dicho anticuerpo está marcado de manera detectable. Las realizaciones de la invención se describen en algunos de los casos siguientes. La presente divulgación está dirigida a moléculas de unión a PD-1 que comprenden el dominio de unión a PD-1 de anticuerpos anti-PD-1 seleccionados capaces de unirse tanto a PD-1 de mono cynomolgus como a PD-1 humana: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15. La divulgación se refiere particularmente a las moléculas de unión a PD-1 que son versiones humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos, o que comprenden fragmentos de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 (especialmente inmunoconjugados, diacuerpos, BiTE, anticuerpos biespecíficos, etc.). La divulgación se refiere particularmente a las moléculas de unión a PD-1 que son capaces además de unirse a un epítipo de una molécula implicada en la regulación de un punto de control inmunitario que está presente en la superficie de una célula inmunitaria. La presente divulgación también se refiere a métodos de uso de tales moléculas de unión a PD-1 para detectar PD-1 o para estimular una respuesta inmunitaria. La presente divulgación también se refiere a métodos de terapia de combinación en los que una molécula de unión a PD-1 que comprende uno o más dominios de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 seleccionados se administra en combinación con uno o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria y/o en combinación con una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno del cáncer.

En detalle, la divulgación proporciona una molécula de unión a PD-1 antihumana que comprende los tres dominios de CDR de cadena pesada, CDR_{H1}, CDR_{H2} y CDR_{H3} y los tres dominios de CDR de cadena ligera, CDR_{L1}, CDR_{L2} y CDR_{L3}, en donde:

(A)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 1, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 71**, **SEQ ID NO: 72** y **SEQ ID NO: 73**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 1, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 76**, **SEQ ID NO: 77** y **SEQ ID NO: 78**;

o
(B)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 2, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 85**, **SEQ ID NO: 86**, y **SEQ ID NO: 87**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 2 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 90**, **SEQ ID NO: 91** y **SEQ ID NO: 92**;

o
(C)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 3, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 99**, **SEQ ID NO: 100** y **SEQ ID NO: 101**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 3 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 104**, **SEQ ID NO: 105** y **SEQ ID NO: 106**;

o
(D)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 4, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 109**, **SEQ ID NO: 110** y **SEQ ID NO: 111**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 4 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 114**, **SEQ ID NO: 115** y **SEQ ID NO: 116**;

o
(E)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 5, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 119**, **SEQ ID NO: 120** y **SEQ ID NO: 121**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 5 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 124**, **SEQ ID NO: 125** y **SEQ ID NO: 126**;

o
(F)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 6, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 129**, **SEQ ID NO: 130** y **SEQ ID NO: 131**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 6 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 134**, **SEQ ID NO: 135** y **SEQ ID NO: 136**;

o
(G)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 7, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 139**, **SEQ ID NO: 140** y **SEQ ID NO: 141**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 7 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 144**, **SEQ ID NO: 145** y **SEQ ID NO: 146**;

o
(H)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 8, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 161**, **SEQ ID NO: 162**, y **SEQ ID NO: 163**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 8 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 166**, **SEQ ID NO: 167** y **SEQ ID NO: 168**;

o
(I)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 9, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 171**, **SEQ ID NO: 172** y **SEQ ID NO: 173**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 9 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 176**, **SEQ ID NO: 177** y **SEQ ID NO: 178**;

ID NO: 178;

^o
(J)

- 5 (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 10, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, y SEQ ID NO: 194;** y
- 10 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 10 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 198 y SEQ ID NO: 199;**

^o
(K)

- 15 (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 11, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 y SEQ ID NO: 204;** y
- 20 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 11 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 208 y SEQ ID NO: 209;**

^o
(L)

- 25 (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 12, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 213, y SEQ ID NO: 214;** y
- 30 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 12 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 y SEQ ID NO: 219**

^o
(M)

- 35 (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 13, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 223, y SEQ ID NO: 224;** y
- 40 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 13 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 228 y SEQ ID NO: 229;**

^o
(N)

- 45 (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 14, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 232, SEQ ID NO: 233, y SEQ ID NO: 234;** y
- 50 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 14 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 237, SEQ ID NO: 238 y SEQ ID NO: 239;**

^o
(O)

- 55 (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de PD-1 mAb 15, y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 242, SEQ ID NO: 243 y S EQ ID NO: 244;** y
- 60 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de PD-1 mAb 15 y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 248 y SEQ ID NO: 249;**

^o
(P)

65

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de hPD-1 mAb 7 (1.2), y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 y SEQ ID NO: 141**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de hPD-1 mAb 7 (1.2) y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 145 y SEQ ID NO: 146**;

o
(Q)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de hPD-1 mAb 7 (1.3), y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140 y SEQ ID NO: 141**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de hPD-1 mAb 7 (1.3) y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158 y SEQ ID NO: 145**;

o
(R)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} son las CDR de cadena pesada de hPD-1 mAb 9 (2.2), y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 172 y SEQ ID NO: 173**; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} son las CDR de cadena ligera de hPD-1 mAb 9 (2.2) y tienen respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 y SEQ ID NO: 178**.

La divulgación se refiere además a los casos de todas estas moléculas de unión a PD-1 antihumanas en donde la molécula es un anticuerpo, y especialmente en donde la molécula es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

La divulgación se refiere además a los casos de tales moléculas de unión a anti-PD-1 humana en donde el dominio variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181 o SEQ ID NO: 250**.

La divulgación se refiere además a los casos de tales moléculas de unión a anti-PD-1 humana en donde el dominio variable de cadena ligera tiene la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 186 o SEQ ID NO: 251**.

La divulgación se refiere además al caso en el que la molécula de unión a PD-1 antihumana es una molécula de unión biespecífica, capaz de unirse simultáneamente a PD-1 humana y a un segundo epítipo, y se refiere particularmente al caso en el que el segundo epítipo es un epítipo de una molécula implicada en la regulación de un punto de control inmunitario presente en la superficie de una célula inmunitaria (especialmente donde el segundo epítipo es un epítipo de B7-H3,

B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC class I or II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 o VISTA, y más particularmente en donde el segundo epítipo es un epítipo de CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT o TIM-3).

La divulgación se refiere además a los casos en los que la molécula de unión a PD-1 antihumana es una molécula biespecífica que comprende un sitio de unión al epítipo LAG-3, particularmente en donde el sitio de unión al epítipo LAG-3 comprende:

(A)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de LAG-3 mAb 1, que tiene las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, y SEQ ID NO: 44**, respectivamente; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de LAG-3 mAb 1, que tiene las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, y SEQ ID NO: 48**, respectivamente;

o
(B)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de hLAG-3 mAb 1 VH1, que tiene las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 42**, **SEQ ID NO: 43**, y **SEQ ID NO: 44**, respectivamente; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de hLAG-3 mAb 1 VL4, que tiene las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 55**, **SEQ ID NO: 47**, y **SEQ ID NO: 48**, respectivamente;

o
(C)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de LAG-3 mAb 6, que tiene las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 57**, **SEQ ID NO: 58**, y **SEQ ID NO: 59**, respectivamente; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de LAG-3 mAb 6, que tiene las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 61**, **SEQ ID NO: 62**, y **SEQ ID NO: 63**, respectivamente;

o
(D)

(1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de hLAG-3 mAb 6 VH1, que tiene las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 57**, **SEQ ID NO: 58**, y **SEQ ID NO: 59**, respectivamente; y

(2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de LAG-3 mAb 6, que tiene las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 298**, **SEQ ID NO: 62**, y **SEQ ID NO: 63**, respectivamente.

La divulgación se refiere además al caso de tales moléculas de unión a PD-1 antihumanas en las que la molécula es un díacuerpo, y especialmente, en las que el díacuerpo es un complejo unido covalentemente que comprende dos, tres, cuatro o cinco cadenas polipeptídicas. La divulgación se refiere además al caso de tales moléculas de unión a PD-1 antihumanas en donde la molécula es una molécula de unión trivalente, y especialmente en donde la molécula de unión trivalente es un complejo unido covalentemente que comprende tres, cuatro, cinco o más de cinco cadenas polipeptídicas. La divulgación se refiere además al caso de tales moléculas de unión a PD-1 antihumanas en donde la molécula comprende una Región Fc. La divulgación se refiere además al caso de tales moléculas de unión a PD-1 antihumanas en donde la molécula comprende un dominio de unión a albúmina, y especialmente un dominio de unión a albúmina desinmunizado.

La divulgación se refiere además a los casos de todas estas moléculas de unión a PD-1 antihumanas en donde la molécula comprende una Región Fc, y en donde la Región Fc es una Región Fc variante que comprende una o más modificaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la Región Fc variante para un FcγR y/o mejora la vida media en suero, y más particularmente, en donde las modificaciones comprenden por lo menos una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

- (1) L234A; L235A;
- (2) L234A y L235A;
- (3) M252Y; M252Y y S254T;
- (4) M252Y y T256E;
- (5) M252Y, S254T y T256E; o
- (6) K288D y H435K;

en donde la numeración es la del índice EU como en Kabat.

La divulgación se refiere además a los casos en los que cualquiera de las moléculas de unión a PD-1 descritas anteriormente se usa para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T. La divulgación se refiere además a los casos en los que cualquiera de las moléculas de unión a PD-1 descritas anteriormente se usa en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un sistema inmunitario suprimido, especialmente cáncer o una infección.

La divulgación se refiere particularmente a dicho uso en el tratamiento o diagnóstico o pronóstico del cáncer, en donde el cáncer se caracteriza por la presencia de una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste de una célula de: un tumor de la glándula suprarrenal, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, tumores del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello uterino, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de células renales cromóforas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor desmoplásico de células

redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ossium de fibrogénesis imperfecta, una displasia fibrosa de hueso, un cáncer de vesícula biliar o de vías biliares, un cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina nerviosa periférica, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un rhabdoides, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejidos blandos, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides y un cáncer de útero.

La divulgación se refiere particularmente a dicho uso en el tratamiento o diagnóstico o pronóstico de cáncer, en donde el cáncer es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de recto, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda B (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), linfomas no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica o linfoma de Burkitt.

La divulgación se refiere además a los casos en los que cualquiera de las moléculas de unión a PD-1 descritas anteriormente se marca detectablemente y se usa en la detección de PD-1.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** proporciona un esquema de un diacuerpo unido covalentemente representativo que tiene dos sitios de unión a epítipo compuestos por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene un dominio promotor de heterodímero en espiral E o espiral K. Un residuo de cisteína puede estar presente en un conector y/o en el dominio promotor de heterodímero como se muestra en la **Figura 3B**. Los dominios de VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.

La **Figura 2** proporciona un esquema de una molécula de diacuerpo unida covalentemente representativa que tiene dos sitios de unión a epítipo compuestos por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales tiene un dominio CH2 y CH3, de tal manera que las cadenas asociadas forman todo o parte de una región Fc. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.

Las **Figuras 3A-3C** proporcionan esquemas que muestran diacuerpos tetravalentes representativos que tienen cuatro sitios de unión a epítopos compuestos por dos pares de cadenas polipeptídicas (es decir, cuatro cadenas polipeptídicas totales). Un polipéptido de cada par posee un dominio CH2 y CH3, de tal manera que las cadenas asociadas forman todo o parte de una región Fc. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno. Los dos pares de cadenas polipeptídicas pueden ser iguales. En tales casos en los que los dominios VL y VH reconocen diferentes epítopos (como se muestra en las **Figuras 3A-3C**), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión al epítipo y es biespecífica y bivalente con respecto a cada epítipo unido. En tales casos en los que los dominios VL y VH reconocen el mismo epítipo (por ejemplo, se usan las mismas CDR del dominio VL y las mismas CDR del dominio VH en ambas cadenas), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión a epítipo y es monoespecífica y tetravalente con respecto a un único epítipo. Alternativamente, los dos pares de polipéptidos pueden ser diferentes. En tales casos en los que los dominios de VL y VH de cada par de polipéptidos reconocen diferentes epítopos (como se muestra en las **Figuras 3A-3C**), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión a epítipo y es tetraespecífica y monovalente con respecto a cada epítipo unido. La **Figura 3A** muestra un diacuerpo Fc que contiene un dominio promotor de heterodímero peptídico que comprende un residuo de cisteína. La **Figura 3B** muestra un diacuerpo que contiene la región Fc, que contiene dominios promotores de heterodímeros en espiral E y espiral K que comprenden un residuo de cisteína y un conector (con un residuo de cisteína opcional). La **Figura 3C**, muestra un diacuerpo que contiene la región Fc, que contiene los dominios CH1 y CL del anticuerpo.

Las **Figuras 4A y 4B** proporcionan esquemas de una molécula de diacuerpo unida covalentemente representativa que tiene dos sitios de unión a epítipo compuestos por tres cadenas polipeptídicas. Dos de las cadenas polipeptídicas poseen un dominio CH2 y CH3, de tal manera que las cadenas asociadas forman todo o parte de una región Fc. Las cadenas polipeptídicas que comprenden los dominios VL y VH comprenden además un dominio promotor de heterodímeros. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.

La **Figura 5** proporciona los esquemas de una molécula de diacuerpo unida covalentemente representativa que tiene cuatro sitios de unión a epítipo compuestos por cinco cadenas polipeptídicas. Dos de las cadenas polipeptídicas poseen un dominio CH2 y CH3, de tal manera que las cadenas asociadas forman una región Fc que comprende toda o parte de una región Fc. Las cadenas polipeptídicas que comprenden los dominios VL y VH enlazados comprenden además un dominio promotor de heterodímeros. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.

Las **Figuras 6A-6F** proporcionan esquemas de moléculas de unión trivalentes que contienen Región Fc representativas que tienen tres sitios de unión a epítopos. Las **Figuras 6A** y **6B**, respectivamente, ilustran esquemáticamente los dominios de moléculas de unión trivalentes que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo y un dominio de unión de tipo Fab que tiene diferentes orientaciones de dominio en los que los dominios de unión de tipo diacuerpo son N-terminales o C-terminales para una Región Fc. Las moléculas en las **Figuras 6A** y **6B** comprenden cuatro cadenas. Las **Figuras 6C** y **6D**, respectivamente, ilustran esquemáticamente los dominios de moléculas de unión trivalentes que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo N-terminales a una región Fc, y un dominio de unión de tipo Fab en el que la cadena ligera y la cadena pesada están enlazadas mediante un espaciador polipeptídico o un dominio de unión de tipo scFv. Las moléculas de unión trivalentes en las **Figuras 6E** y **6F**, respectivamente ilustran esquemáticamente los dominios de moléculas de unión trivalentes que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo C-terminales a una región Fc, y un dominio de unión de tipo Fab enlazado, o un dominio de unión de tipo scFv en el que los dominios de unión de tipo diacuerpo son. Las moléculas de unión trivalentes en las **Figuras 6C-6F** comprenden tres cadenas. Los dominios VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran usando el mismo patrón de sombreado o relleno.

Las **Figuras 7A-7D** muestran que los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se unen a PD-1 humana. Las curvas de unión para la unión a shPD-1-His se muestran en la **Figura 7A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4 y PD-1 mAb 9), la **Figura 7B** (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6 y PD-1 mAb 7), y la **Figura 7C** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 y PD-1 mAb 15). Las curvas de unión para la unión a shPD-1-Fc humano se muestran en la **Figura 7D** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 y PD-1 mAb 15).

Las **Figuras 8A-8C** muestran que los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se unen a PD-1 de mono cynomolgus. Las curvas de unión para la unión a scynoPD-1-hFc se muestran en la **Figura 8A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7), la **Figura 8B** (PD-1 mAb 9) y la **Figura 8C** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 y PD-1 mAb 15).

Las **Figuras 9A-9D** muestran la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 para bloquear la unión de PD-L1 humana a PD-1 humana. Las curvas de inhibición se muestran en la **Figura 9A** (PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 15 y PD-1 mAb A), la **Figura 9B** (PD-1 mAb 4), la **Figura 9C** (PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7 y PD-1 mAb A), y la **Figura 9D** (PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, PD-1 mAb 15 y PD-1 mAb A).

Las **Figuras 10A-10B** muestran la especificidad de tejido del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7. La **Figura 10A** muestra tinciones histológicas de tejido de colon normal (**paneles i** y **vii**), hígado (**Paneles ii** y **viii**), pulmón (**paneles iii** y **ix**), páncreas (**Paneles iv** y **x**), riñón (**paneles v** y **xii**) y el corazón (**Paneles vi** y **xii**). La **Figura 10A**, **paneles i-vi** muestran los resultados del tejido incubado con PD-1 mAb 7 marcado (0,313 µg/ml). La **Figura 10A**, **paneles vii-xii** muestran los resultados del tejido incubado con mAb de control de isotipo marcado (0,314 µg/ml). La **Figura 10B** muestra tinciones histológicas de piel (**paneles i** y **iv**), amígdalas (**paneles ii** y **v**) y células NSO que expresan PD-1 (**paneles iii** y **vi**). La **Figura 10B**, **paneles i-iii** muestran los resultados del tejido incubado con PD-1 mAb 7 marcado (0,313 µg/ml).

La **Figura 11** muestra los perfiles de unión de anticuerpos anti-PD-1 humana humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.1), hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1) y anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B que tienen IgG1 (AA) o IgG4 (P) para unirse a PD-1 de superficie celular.

Las **Figuras 12A-12B** muestran la capacidad de los anticuerpos anti-PD humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.1), hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1) y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B, que tienen IgG1 (AA) o IgG4 (P) para bloquear la unión de PD-L1 humana soluble (**Figura 12A**) y PD-L2 humana soluble (**Figura 12B**) a la PD-1 humana de la superficie celular.

La **Figura 13** muestra la capacidad de los anticuerpos anti-PD humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.1), hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1) y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B, que tienen IgG1 (AA) o IgG4 (P) para antagonizar el eje PD-1/PD-L1 al bloquear la interacción PD-1/PD-L1 y prevenir la regulación por disminución de respuestas de células T en un ensayo informador de luciferasa Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1.

La **Figura 14** muestra que PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 son capaces de

estimular la producción de citoquinas a niveles comparables o superiores a los anticuerpos anti-PD-1 referenciados (PD-1 mAb A y PD-1 mAb B) y que el tratamiento con PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 en combinación con LAG-3 mAb 1 proporcionó la mayor mejora de la liberación de citoquinas. Los perfiles de secreción de IFN γ de PBMC estimuladas con enterotoxina B *Staphylococcal* (SEB) tratadas con anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación.

Las **Figuras 15A-15B** muestran la capacidad de los anticuerpos anti-PD humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1,2), hPD-1 mAb 9 (1.1) y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B, que tienen IgG1 (AA) o IgG4 (P) para estimular la producción de citoquinas. Perfiles de secreción de IFN γ (**Figura 15A**) y TNF α (**Figura 15B**), de PBMC estimuladas con SEB tratadas con anticuerpos anti-PD-1.

Las **Figuras 16A-16B** muestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART A, DART D, DART E, DART F, DART G y DART H, son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles comparables o superiores a los observados con la administración del combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A), y que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART A, DART D, DART E, DART F y DART G proporcionaron la mejora más grande en la liberación de citoquinas. Se representan los perfiles de secreción de IFN γ de PBMC estimuladas con una concentración baja de SEB (0,2 ng/ml) tratado con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación. Los resultados usando PBMC de dos donantes representativos se muestran en la **Figura 16A** y la **Figura 16B**.

Las **Figuras 17A-17B** muestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART A, DART B y DART C son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles más altos que los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Se representan perfiles de secreción de IFN γ de PBMC de dos donantes representativos, estimulados con una concentración alta de SEB (85 ng/ml) tratados con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación. Los resultados usando PBMC de dos donantes representativos se muestran en la **Figura 17A** y la **Figura 17B**.

Las **Figuras 18A-18B** muestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART A, DART B y DART C son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles más altos que los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Se representan los perfiles de secreción de IFN γ de PBMC de dos donantes representativos, estimulados con una concentración media de SEB (0,5 ng/ml) tratados con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación. Los resultados usando PBMC de dos donantes representativos se muestran en la **Figura 18A** y la **Figura 18B**.

La **Figura 19** muestra que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART D y DART H son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles comparables o superiores a los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A), y que DART D proporcionó la mejora más alta de liberación de citoquinas. Se representan los perfiles de secreción de IL-2 de PBMC de un donante representativo estimulado con una alta concentración de SEB (85 ng/ml) tratado con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación.

La **Figura 20** muestra que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 DART B y DART I son capaces de estimular la producción de citoquinas a niveles más altos que los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A, hPD-1 mAb 7 (1,2) + hLAG-3 mAb 1 (1,4), hPD-1 mAb 7 (1,2) + hLAG-3 mAb 6 (1,1)). Se representan los perfiles de secreción de IFN γ de PBMC de un donante representativo, estimulado con una concentración media de SEB (0,5 ng/ml) tratados con diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, o anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solos y en combinación.

Las **Figuras 21A-21D** muestran que el diacuerpo biespecífico PD-1 x LAG-3 DART I es capaz de estimular la producción de citoquinas a niveles más altos que los observados tras la administración de la combinación de un mAb anti-PD-1 + un mAb anti-LAG-3 (PD-1 mAb A + LAG-3 mAb A). Se representan los perfiles de secreción de IFN γ (**Figuras 21A y 21C**) e IL-2 (**Figuras 21B y 21D**) de células de memoria CD4 de dos donantes representativos, estimulados con toxoide tetánico (5 μ g/ml) tratados con el diacuerpo biespecífico PD-1 x LAG-3 DART-I, anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 en combinación, o un control de isotipo. Los resultados en el día 7 usando células T de memoria CD4 de dos donantes representativos se muestran en las **Figuras 21A-B** y las **Figuras 21C-D**.

La **Figura 22** muestra que la farmacocinética de la molécula biespecífica PD-1 x LAG-3, DART I es comparable a la del anticuerpo anti-PD-1, PD-1 mAb A IgG4 (P) en mono cynomolgus. Las líneas indican la concentración sérica media de DART I (sólido) y PD-1 mAb A (discontinuo). Los valores individuales para los monos macho (relleno) y hembra (abierto) se representan para DART I (triángulos) y PD-1 mAb A (círculos).

Las **Figuras 23A-23C** muestran las concentraciones de anticuerpos en suero y el porcentaje de PD-1 unido en la superficie de las células T CD4+ o CD8+ a lo largo del tiempo en animales después del tratamiento con

diferentes anticuerpos anti-PD-1. El porcentaje de PD 1 unida en la superficie de las células T CD4+ o CD8+ después del tratamiento con mAb anti-PD 1 se representa en los ejes y derechos; los símbolos representan el % de PD1 unida en las células T para cada animal individual y las líneas discontinuas representan los valores medios. Las concentraciones séricas de mAb se representan en el eje y izquierdo; los símbolos representan los niveles séricos de cada animal individual y las líneas continuas representan ajustes no lineales de los datos. Cada panel presenta datos para animales (n = 1/sexo/grupo) administrados 10 mg/kg hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) (**Figura 23A**), PD-1 mAb A IgG4 (P) (**Figura 23B**), o PD-1 mAb B IgG4 (P) (**Figura 23B**) por infusión intravenosa el día 1.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación está dirigida a moléculas de unión a PD-1 que comprenden el dominio de unión a PD-1 de anticuerpos anti-PD-1 seleccionados capaces de unirse tanto a PD-1 de mono cynomolgus como a PD-1 humana: PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD -1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15. La descripción se refiere particularmente a moléculas de unión a PD-1 que son versiones humanizadas o quiméricas de tales anticuerpos, o que comprenden fragmentos de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 (especialmente inmunoconjugados, diacuerpos (incluyendo pero no limitados a, DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I y DART-J), BiTE, anticuerpos biespecíficos, etc.). La divulgación se refiere particularmente a tales moléculas de unión a PD-1 que, además, son capaces de unirse a un epítipo de una molécula implicada en la regulación de un punto de control inmunitario que está presente en la superficie de una célula inmunitaria. La presente divulgación también se refiere a métodos de uso de tales moléculas de unión a PD-1 para detectar PD-1 o para estimular una respuesta inmunitaria. La presente divulgación también se refiere a métodos de terapia de combinación en los que una molécula de unión a PD-1 que comprende uno o más dominios de unión a PD-1 de tales anticuerpos anti-PD-1 seleccionados se administra en combinación con una o más moléculas adicionales que son eficaces para estimular una respuesta inmunitaria y/o en combinación con una o más moléculas adicionales que se unen específicamente a un antígeno de cáncer.

I. Anticuerpos y sus dominios de unión

Los anticuerpos de la presente divulgación son moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse específicamente a un objetivo, como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de por lo menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en el dominio variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en la presente, los términos "**anticuerpo**" y "**anticuerpos**" se refieren a anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales, anticuerpos camelizados, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fvs biespecíficos enlazados con disulfuro (sdFv), intracuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase. Además de sus usos conocidos en el diagnóstico, se ha demostrado que los anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos. Los anticuerpos son capaces de unirse inmuno-específicamente a un polipéptido o proteína o una molécula no proteica debido a la presencia en dicha molécula de un dominio o fracción o conformación particular (un "epítipo"). Una molécula que contiene un epítipo puede tener actividad inmunogénica, de tal manera que provoque una respuesta de producción de anticuerpos en un animal; tales moléculas se denominan "**antígenos**"). Las últimas décadas han visto un resurgimiento del interés en el potencial terapéutico de los anticuerpos, y los anticuerpos se han convertido en una de las clases principales de fármacos derivados de la biotecnología (Chan, CE et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases," Singapore Med. J. 50(7):663-666). Se han aprobado para su uso o están en desarrollo más de 200 fármacos basados en anticuerpos.

El término "**anticuerpo monoclonal**" se refiere a una población de anticuerpos homogénea en la que el anticuerpo monoclonal está compuesto por aminoácidos (de origen natural y no natural) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un solo epítipo (o sitio antigénico). El término "anticuerpo monoclonal" abarca no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (como Fab, Fab', F(ab')₂Fv), de cadena sencilla (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad y capacidad requeridas para unirse a un antígeno. No se pretende que esté limitado con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en que se elabora (por ejemplo, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas, así como fragmentos, etc. descritos anteriormente bajo la definición de "anticuerpo". En la técnica se conocen métodos para elaborar anticuerpos monoclonales. Un método que puede emplearse es el método de Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", Nature 256:495-497 o una modificación del mismo. Típicamente, los anticuerpos monoclonales se desarrollan en ratones, ratas o conejos. Los anticuerpos se

producen inmunizando a un animal con una cantidad inmunogénica de células, extractos de células o preparaciones de proteínas que contienen el epítipo deseado. El inmunógeno puede ser, pero no se limita a, células primarias, líneas celulares cultivadas, células cancerosas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o tejido. Las células usadas para la inmunización pueden cultivarse durante un período de tiempo (por ejemplo, por lo menos 24 horas) antes de su uso como inmunógeno. Las células pueden usarse como inmunógenos por sí mismas o en combinación con un adyuvante no desnaturizante, como Ribi (ver, por ejemplo, Jennings, VM (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production", ILAR J. 37 (3): 119-125). En general, las células deben mantenerse intactas y preferiblemente viables cuando se usan como inmunógenos. Las células intactas pueden permitir que el animal inmunizado detecte mejor los antígenos que las células rotas. El uso de adyuvantes desnaturizantes o agresivos, por ejemplo, adyuvante de Freud, puede romper las células y, por lo tanto, se desaconseja. El inmunógeno puede administrarse varias veces a intervalos periódicos, como cada dos semanas o semanalmente, o puede administrarse de tal manera que se mantenga la viabilidad en el animal (por ejemplo, en un tejido recombinante). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales existentes y cualquier otro anticuerpo equivalente que sea inmuno-específico para un epítipo patógeno deseado pueden secuenciarse y producirse de manera recombinante mediante cualquier medio conocido en la técnica. En un caso, se secuencian un anticuerpo de este tipo y luego se clona la secuencia de polinucleótidos en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula huésped y la célula huésped puede luego expandirse y congelarse para uso futuro. La secuencia de polinucleótidos de tales anticuerpos puede usarse para manipulación genética para generar moléculas mono-específicas o multi-específicas (por ejemplo, bio-específicas, tri-específicas y tetra-específicas) de la divulgación así como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y/o un anticuerpo caninizado optimizados por afinidad, para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. El principio general en la humanización de un anticuerpo implica retener la secuencia básica de la porción del anticuerpo que se une al antígeno, mientras se intercambia el resto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpos humanos.

Los anticuerpos naturales (como los anticuerpos IgG) se componen de dos **cadena ligera** complejadas con dos **cadena pesada**. Cada cadena ligera contiene un dominio variable (**VL**) y un dominio constante (**CL**). Cada cadena pesada contiene un dominio variable (**VH**), tres dominios constantes (**CH1**, **CH2** y **CH3**) y un dominio bisagra localizado entre los dominios **CH1** y **CH2**. La unidad estructural básica de las inmunoglobulinas de origen natural (por ejemplo, IgG) es, por tanto, un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, habitualmente expresado como una glicoproteína de aproximadamente 150.000 Da. La porción amino-terminal ("N-terminal") de cada cadena incluye un Dominio Variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal ("C-terminal") de cada cadena define una región constante, con cadenas ligeras que tienen un único dominio constante y cadenas pesadas que habitualmente tienen tres dominios constantes y un dominio bisagra. Por tanto, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-VL-CL-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (donde H es el dominio bisagra, y n y c representan, respectivamente, el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido). Los dominios variables de una molécula de IgG consisten de las regiones determinantes de la complementariedad (**CDR**), que contienen los residuos en contacto con el epítipo, y segmentos no CDR, denominados segmentos marco (**FR**), que en general mantienen la estructura y determinan el posicionamiento de los giros de CDR para permitir tal contacto (aunque ciertos residuos marco también pueden entrar en contacto con el antígeno). Por tanto, los dominios VL y VH tienen la estructura n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c. Los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda y tercera CDR de una cadena ligera de anticuerpo están designados en la presente respectivamente **dominio de CDR_{L1}**, **dominio de CDR_{L2}**, y **dominio de CDR_{L3}**. De manera similar, los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda y tercera CDR de una cadena pesada de anticuerpo se designan en la presente respectivamente **dominio de CDR_{H1}**, **dominio de CDR_{H2}**, y **dominio de CDR_{H3}**. Por tanto, los términos dominio de CDR_{L1}, dominio de CDR_{L2}, dominio de CDR_{L3}, dominio de CDR_{H1}, dominio de CDR_{H2} y dominio de CDR_{H3} se dirigen a polipéptidos que cuando se incorporan a una proteína hacen que esa proteína sea capaz de unirse a un epítipo específico independientemente de si dicha proteína es un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas o un diacuerpo o una molécula de unión de cadena sencilla (por ejemplo, un scFv, un BiTe, etc.), o es otro tipo de proteína. Por consiguiente, como se usa en la presente, el término **"fragmento de unión a epítipo"** significa un fragmento de un anticuerpo capaz de unirse inmuno-específicamente a un epítipo, y el término **"sitio de unión a epítipo"** se refiere a la porción de una molécula que comprende un fragmento de unión al epítipo que es responsable de la unión al epítipo. Un sitio de unión a epítipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o los 6 dominios de CDR de dicho anticuerpo y, aunque es capaz de unirse inmuno-específicamente a dicho epítipo, puede mostrar una inmuno-especificidad, afinidad o selectividad hacia dicho epítipo que difiere de la de dicho anticuerpo. Sin embargo, preferiblemente, un fragmento de unión a epítipo contendrá los 6 dominios de CDR de dicho anticuerpo. Un fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo puede ser una única cadena polipeptídica (por ejemplo, un scFv), o puede comprender dos o más cadenas polipeptídicas, cada una con un extremo terminal amino y un extremo terminal carboxi (por ejemplo, un diacuerpo, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, etc.).

La divulgación abarca particularmente fragmentos de dominio variable de cadena sencilla (**"scFv"**) de los anticuerpos anti-PD-1 de esta divulgación y moléculas de unión multi-específicas que comprenden los mismos. Los fragmentos de dominio variable de cadena sencilla se preparan enlazando el dominio variable de cadena ligera y/o pesada usando un péptido de enlace corto. Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science

242:423-426) describe un ejemplo de péptidos de enlace que forman un puente de aproximadamente 3,5 nm entre el extremo terminal carboxi de un dominio variable y el extremo terminal amino del otro dominio variable. Se han diseñado y usado conectores de otras secuencias (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426). A su vez, los conectores pueden modificarse para funciones adicionales, como la unión de fármacos o la unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena sencilla pueden producirse de manera recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contenga el polinucleótido que codifica el scFv en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, como células de levadura, vegetales, de insectos o de mamíferos, o procariotas, como E. coli. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden elaborarse mediante manipulaciones rutinarias como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en la técnica.

La divulgación también abarca particularmente variantes humanizadas de los anticuerpos anti-PD-1 de la divulgación y moléculas de unión multispecíficas que comprenden los mismos. El término anticuerpo **"humanizado"** se refiere a una molécula quimérica, preparada generalmente usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión al antígeno de una inmunoglobulina de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina restante de la molécula que se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos anti-PD-1 humana de la presente divulgación incluyen variantes humanizadas, quiméricas o caninizadas de anticuerpos PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15. La secuencia de polinucleótidos de los dominios variables de tales anticuerpos puede usarse para manipulación genética para generar tales derivados y mejorar la afinidad u otras características de tales anticuerpos. El principio general en la humanización de un anticuerpo implica retener la secuencia básica de la porción de unión al antígeno del anticuerpo, mientras se intercambia el resto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpos humanos. Hay cuatro pasos generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estos son: (1) determinar el nucleótido y la secuencia de aminoácidos predicha de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado o el anticuerpo caninizado, es decir, decidir qué región marco del anticuerpo usar durante el proceso de humanización o caninización (3) las metodologías/técnicas de humanización o caninización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Ver, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; y 6.331.415.

El sitio de unión al antígeno puede comprender o un Dominio Variable completo fusionado a un Dominio Constante o solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de dicho Dominio Variable injertadas en regiones marco apropiadas. Los sitios de unión a antígenos pueden ser de tipo salvaje o estar modificados mediante una o más sustituciones de aminoácidos. Esto elimina la región constante como inmunógeno en individuos humanos, pero la posibilidad de una respuesta inmunitaria al dominio variable extraño permanece (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224). Otro enfoque se centra no solo en proporcionar regiones constantes derivadas de humanos, sino también en modificar los dominios variables y remodelarlos lo más cerca posible de la forma humana. Se sabe que los dominios variables de las cadenas pesada como ligera contienen tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) que se conservan relativamente en una especie determinada y que supuestamente proporcionan un andamiaje para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, los dominios variables pueden "reformarse" o "humanizarse" injertando CDR derivadas de anticuerpos no humanos en las FR presentes en el anticuerpo humano que se va a modificar. La aplicación de este enfoque a varios anticuerpos se ha informado por Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; y Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154. En algunos casos, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de las CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otros casos, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) que difieren en secuencia con respecto al anticuerpo original.

Se han descrito una serie de moléculas de anticuerpos "humanizadas" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen un dominio variable de roedor o roedor modificado y sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) asociadas fusionadas con dominios constantes humanos (ver, por ejemplo, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies," Nature

349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen," J. Immunol. 138:4534-4538, y Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody," Cancer Res. 47:3577-3583). Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región marco de soporte humano (FR) antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado (ver, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; y Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," Nature 321:522-525). Otra referencia describe las CDR de roedor soportadas por regiones marco de roedor revestidas recombinantemente. Ver, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea N° 519.596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpos antihumanos de roedores, lo que limita la duración y la eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esas fracciones en receptores humanos. Otros métodos de humanización de anticuerpos que también pueden utilizarse se divulgan en Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 y en las Patentes de Estados Unidos N°. 6.180.377; 6.054.297; 5,997,867; y 5,866,692.

II. Receptores Fcγ (FcγRs)

Los dominios CH2 y CH3 de las dos cadenas pesadas interactúan para formar la **región Fc**, que es un dominio que es reconocido por los **receptores Fc** celulares, incluyendo pero no limitados a, los receptores gamma Fc (**FcγR**). Como se usa en la presente, el término "Región Fc" se usa para definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG1 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 1**):

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	
340	350	360	370	380	
PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
390	400	410	420	430	
WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
440	447				
ALHNHYTQKS	LSLSPGX				

numerado por el índice EU como se expone en Kabat, en donde X es una lisina (K) o está ausente.

La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG2 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 2**):

ES 2 898 958 T3

	231	240	250	260	270	280
	APPVA-GPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFNWYVD	
5		290	300	310	320	330
	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPA	
10		340	350	360	370	380
	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDISVE	
15		390	400	410	420	430
	WESNGQPENN	YKTPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
20		440	447			
	ALHNHYTQKS	LSLSPG	<u>X</u>			

numerado por el índice EU como se expone en Kabat, en donde X es una lisina (K) o está ausente.

25 La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG3 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 3**):

	231	240	250	260	270	280
	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFKWYVD	
30		290	300	310	320	330
	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	
35		340	350	360	370	380
	PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
40		390	400	410	420	430
	WESSGQPENN	YNTTPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NIFSCSVMHE	
45		440	447			
	ALHNRFTQKS	LSLSPG	<u>X</u>			

numerado por el índice EU como se expone en Kabat, en donde X es una lisina (K) o está ausente.

50

La secuencia de aminoácidos del dominio CH2-CH3 de una IgG4 humana ejemplar es (**SEQ ID NO: 4**):

231 240 250 260 270 280
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
 5 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 10 340 350 360 370 380
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 15 390 400 410 420 430
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE
 20 440 447
 ALHNHYTQKS LSLSLG**X**

numerado por el índice EU como se expone en Kabat, en donde **X** es una lisina (K) o está ausente.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos en la región constante de una
 25 cadena pesada de IgG es la del índice EU como en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª
 Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) ("Kabat"), expresamente. El término "índice EU como en Kabat" se
 refiere a la numeración del anticuerpo EU de IgG1 humana. Los aminoácidos de los dominios variables de las
 cadenas pesadas y ligeras maduras de las inmunoglobulinas se designan por la posición de un aminoácido en la
 30 cadena. Kabat describió numerosas secuencias de aminoácidos para anticuerpos, identificó una secuencia de
 consenso de aminoácidos para cada subgrupo y asignó un número de residuo a cada aminoácido, y las CDR se
 identifican como se define por Kabat (se entenderá que la CDR_{H1} como se define por Chothia, C. & Lesk, A. M.
 ((1987) "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917) empieza
 35 cinco residuos antes). El esquema de numeración de Kabat es extensible a los anticuerpos no incluidos en su
 compendio alineando el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat por referencia a
 los aminoácidos conservados. Este método para asignar números de residuos se ha convertido en estándar en el
 campo e identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en diferentes anticuerpos, incluyendo
 40 variantes quiméricas o humanizadas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de un
 anticuerpo humano ocupa la posición equivalente a un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de un
 anticuerpo de ratón.

Se han observado polimorfismos en una serie de posiciones diferentes dentro de las regiones constantes
 del anticuerpo (por ejemplo, posiciones CH1, incluyendo pero no limitadas a, las posiciones 192, 193 y 214;
 posiciones de Fc, incluyendo pero no limitadas a, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356 y 358 numeradas por el
 45 índice EU como se expone en Kabat), y por lo tanto pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada
 y las secuencias en el estado de la técnica. Las formas polimórficas de inmunoglobulinas humanas se han
 caracterizado bien. En la actualidad se conocen 18 alotipos Gm: G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o
 G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5)
 (Lefranc, et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation." Pergamon,
 Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Se contempla específicamente que los
 50 anticuerpos de la presente divulgación pueden incorporar cualquier alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen
 de inmunoglobulina, y no se limitan al alotipo, isoalotipo o haplotipo de las secuencias proporcionadas en la
 presente. Además, en algunos sistemas de expresión, el residuo de aminoácido C-terminal (en negrita arriba) del
 dominio CH3 puede eliminarse postraduccionalmente. Por consiguiente, el residuo C-terminal del dominio CH3 es un
 residuo de aminoácido opcional en las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación. Específicamente incluidas por la
 55 presente divulgación están las moléculas de unión a PD-1 que carecen del residuo C-terminal del dominio CH3.
 También se incluyen específicamente en la presente divulgación tales constructos que comprenden el residuo de
 lisina C-terminal del dominio CH3.

Las señales activadoras e inhibidoras se transducen mediante la ligación de una región Fc a un receptor
 60 gamma Fc celular (FcγR). La capacidad de tal ligación para dar como resultado funciones diametralmente opuestas
 resulta de diferencias estructurales entre los diferentes FcγR. Dos dominios distintos dentro de los dominios de
 señalización citoplásmica del receptor denominados motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina
 (ITAM) y motivos inhibidores de inmunorreceptores basados en tirosina (ITIMS) explican las diferentes respuestas.
 El reclutamiento de diferentes enzimas citoplasmáticas en estas estructuras dicta el resultado de las respuestas
 65 celulares mediadas por FcγR. Los complejos de FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIA,

mientras que los complejos que contienen ITIM solo incluyen FcγRIIB. Los neutrófilos humanos expresan el gen FcγRIIA. La agrupación de FcγRIIA mediante inmunocomplejos o reticulación de anticuerpos específicos sirve para agregar ITAM junto con quinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para la quinasa Syk, cuya activación da como resultado la activación de sustratos en sentido descendente (por ejemplo, PI₃K). La activación celular lleva a la liberación de mediadores proinflamatorios. El gen FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es un 96% idéntico al de FcγRIIA y se une a los complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibidora de FcγR. Recientemente se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se coliga junto con un FcγR activador, el ITIM en FcγRIIB se fosforila y atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de tirosina quinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, evitando en consecuencia la entrada de Ca⁺⁺ intracelular. Por tanto, la reticulación de FcγRIIB amortigua la respuesta de activación al ligamiento de FcγR e inhibe la capacidad de respuesta celular. Por tanto, se interrumpe la activación de células B, la proliferación de células B y la secreción de anticuerpos.

III. Anticuerpos biespecíficos, diacuerpos multiespecíficos y diacuerpos DART®

La capacidad de un anticuerpo para unirse a un epítipo de un antígeno depende de la presencia y secuencia de aminoácidos de los dominios VL y VH del anticuerpo. La interacción de una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo y, en particular, la interacción de sus dominios VL y VH forma uno de los dos sitios de unión al epítipo de un anticuerpo natural. Los anticuerpos naturales son capaces de unirse a una sola especie de epítipo (es decir, son monoespecíficos), aunque pueden unirse a múltiples copias de esa especie (es decir, mostrando bivalencia o multivalencia).

Los dominios de unión de la presente divulgación se unen a epítopos de una manera **"inmunoespecífica"**. Como se usa en la presente, se dice que un anticuerpo, diacuerpo u otra molécula de unión a epítipo se une **"inmunoespecíficamente"** a una región de otra molécula (es decir, un epítipo) si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con ese epítipo con respecto a epítopos alternativos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo viral es un anticuerpo que se une a este epítipo viral con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une inmunoespecíficamente a otros epítopos virales o epítopos no virales. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o fracción o epítipo) que se une inmunoespecíficamente a un primer objetivo puede unirse o no específica o preferentemente a un segundo objetivo. Como tal, la "unión inmunoespecífica" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión "específica". Se dice que dos moléculas son capaces de unirse entre sí de manera **"fisioespecífica"**, si tal unión presenta la especificidad con la que los receptores se unen a sus ligandos respectivos.

La funcionalidad de los anticuerpos puede mejorarse generando moléculas multiespecíficas basadas en anticuerpos que puedan unirse simultáneamente a dos antígenos separados y distintos (o diferentes epítopos del mismo antígeno) y/o generando una molécula basada en anticuerpos que tenga una mayor valencia (es decir, más de dos sitios de unión) para el mismo epítipo y/o antígeno.

Para proporcionar moléculas que tengan mayor capacidad que los anticuerpos naturales, se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombinantes (ver, por ejemplo, Publicaciones de PCT N° WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), la mayoría de los cuales usan péptidos conectores para fusionar un fragmento de unión a epítipo adicional (por ejemplo, un scFv, VL, VH, etc.) al núcleo del anticuerpo o dentro del mismo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM), o para fusionar múltiples fragmentos de unión a epítopos (por ejemplo, dos fragmentos Fab o scFv). Los formatos alternativos usan péptidos conectores para fusionar un fragmento de unión a epítipo (por ejemplo, un scFv, VL, VH, etc.) a un dominio de dimerización como el dominio CH2-CH3 o polipéptidos alternativos (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Típicamente, estos enfoques implican compromisos y compensaciones. Por ejemplo, las Publicaciones de PCT N° WO 2013/174873, WO 2011/133886 y WO 2010/136172 divulgan que el uso de conectores puede provocar problemas en entornos terapéuticos, y enseña un anticuerpo trispecífico en el que los dominios CL y CH1 se intercambian de sus respectivas posiciones naturales y los dominios VL y VH se han diversificado (WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitirles unirse a más de un antígeno. Por tanto, las moléculas divulgadas en estos documentos intercambian especificidad de unión por la capacidad de unirse a especies de antígenos adicionales. Las Publicaciones de PCT N° WO 2013/163427 y WO 2013/119903 divulgan la modificación del dominio CH2 para que contenga un aducto de proteína de fusión que comprende un dominio de unión. El documento indica que el dominio CH2 probablemente solo desempeña un papel mínimo en la mediación de la función efectora. Las Publicaciones de PCT N° WO 2010/028797, WO2010028796 y WO 2010/028795 divulgan anticuerpos recombinantes cuyas regiones Fc han sido reemplazadas con dominios VL y VH adicionales, para formar moléculas de unión trivalentes. Las Publicaciones de PCT N°. WO 2003/025018 y WO2003012069 divulgan diacuerpos recombinantes cuyas cadenas individuales contienen dominios scFv. La Publicación de PCT N° WO 2013/006544

divulga moléculas Fab multivalentes que se sintetizan como una única cadena polipeptídica y luego se someten a proteólisis para producir estructuras heterodiméricas. Por tanto, las moléculas divulgadas en estos documentos intercambian toda o parte de la capacidad de mediar la función efectora por la capacidad de unirse a especies de antígenos adicionales. Las Publicaciones de PCT N° WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 y WO 1991/003493 divulgan la adición de dominios de unión o grupos funcionales adicionales a un anticuerpo o una porción de anticuerpo (por ejemplo, añadir un diacuerpo a la cadena ligera del anticuerpo, o añadir dominios VL y VH adicionales a las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo, o añadir una proteína de fusión heteróloga o encadenando múltiples dominios Fab entre sí). Por tanto, las moléculas divulgadas en estos documentos intercambian la estructura del anticuerpo nativa por la capacidad de unirse a especies de antígenos adicionales.

La técnica también ha indicado la capacidad de producir diacuerpos que difieren de tales anticuerpos naturales en ser capaces de unirse a dos o más especies de epítomos diferentes (es decir, mostrando biespecificidad o multiespecificidad además de bivalencia o multivalencia) (ver, por ejemplo, Holliger et al. (1993) "Diabodies: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy," Cancer Res. 69(12):4941-4944).

El diseño de un diacuerpo se basa en el derivado de anticuerpo conocido como fragmento de dominio variable de cadena sencilla (**scFv**). Tales moléculas se preparan enlazando dominios variables de cadena ligera y/o pesada mediante el uso de un péptido de enlace corto. Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242: 423-426) describe un ejemplo de péptidos de enlace que forman un puente de aproximadamente 3,5 nm entre el extremo terminal carboxi de un dominio variable y el extremo terminal amino del otro dominio variable. Se han diseñado y usado conectores de otras secuencias (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242: 423-426). A su vez, los conectores pueden modificarse para funciones adicionales, como la unión de fármacos o la unión a soportes sólidos. Las variantes de cadena sencilla pueden producirse de manera recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede usarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contenga polinucleótido que codifique el scFv en una célula huésped adecuada, ya sea eucariota, como células de levadura, plantas, insectos o mamíferos, o procariotas, como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden prepararse mediante manipulaciones de rutina como ligación de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse usando técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en la técnica.

La provisión de diacuerpos no monoespecíficos proporciona una ventaja significativa sobre los anticuerpos, que incluye, pero no se limita a, la capacidad de co-ligar y co-localizar células que expresan diferentes epítomos. Por tanto, los diacuerpos biespecíficos tienen una amplia variedad de aplicaciones que incluyen la terapia y el inmunodiagnóstico. La biespecificidad permite una gran flexibilidad en el diseño y la modificación del diacuerpo en varias aplicaciones, proporcionando una avidez mejorada por los antígenos multiméricos, la reticulación de diferentes antígenos y el direccionamiento dirigido a tipos de células específicos que dependen de la presencia de ambos antígenos objetivo. Debido a su valencia aumentada, bajas tasas de disociación y rápida depuración de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, de 50 kDa o menos), las moléculas de diacuerpos conocidas en la técnica también han mostrado un uso particular en el campo de la imagenología de tumores (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*", Protein Eng. 10:1221).

La biespecificidad de los diacuerpos ha llevado a su uso para la coligadura de células diferentes, por ejemplo, la reticulación de células T citotóxicas con células tumorales (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", Nature 314:628-631, y Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305; Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Alternativa, o adicionalmente, pueden usarse diacuerpos biespecíficos para coligar receptores en la superficie de diferentes células o en una sola célula. La coligación de diferentes células y/o receptores es útil para modular las funciones efectoras y/o la señalización de las células inmunes. Pueden dirigirse moléculas multiespecíficas (por ejemplo, diacuerpos biespecíficos) que comprenden sitios de unión a epítomos a un determinante de superficie de cualquier célula inmunitaria como B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), BTLA (CD272), CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L,

CD47, CD64, CD70 (CD27L), CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD94 (KLRD1), CD137 (4-1BB), CD137L (4-1BBL), CD226, CTLA-4 (CD152), Galectin-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS (CD278), ICOSL (CD275), receptor de activación de asesinas (KIR), LAG-3 (CD223), LIGHT (TNFSF14, CD258), MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40 (CD134), OX40L (CD134L), PD1H, PD-1 (CD279), PD-L1 (B7-H1, CD274), PD-L2 (B7-CD, CD273), PVR (NECL5, CD155), SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 (HAVCR2), y/o VISTA (PD-1H), que se expresan en linfocitos T, células asesinas naturales (NK), células presentadoras de antígenos u otras células mononucleares celda. En particular, Los sitios de unión a epítomos dirigidos a un receptor de la superficie celular que participa en la regulación de un punto de control inmunológico (o el ligando del mismo) son útiles en la generación de moléculas de unión biespecíficas o multiespecíficas que antagonizan o bloquean la señalización inhibitoria de las moléculas del punto de control inmunológico y de este modo estimulan, regulan por incremento o potencian las respuestas inmunitarias en un sujeto. Las moléculas implicadas en la regulación de los puntos de control inmunológico incluyen, pero no se limitan a, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectina-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 y/o VISTA.

Sin embargo, las ventajas anteriores tienen un costo destacado. La formación de tales diacuerpos no mono-específicos requiere el ensamblaje con éxito de dos o más polipéptidos distintos y diferentes (es decir, tal formación requiere que los diacuerpos se formen mediante la heterodimerización de diferentes especies de cadenas polipeptídicas). Este hecho contrasta con los diacuerpos mono-específicos, que se forman mediante la homodimerización de cadenas polipeptídicas idénticas. Porque deben proporcionarse por lo menos dos polipéptidos diferentes (es decir, dos especies de polipéptidos) para formar un diacuerpo no mono-específico, y porque la homodimerización de tales polipéptidos lleva a moléculas inactivas (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588), la producción de tales polipéptidos debe lograrse de tal manera que se evite la unión covalente entre polipéptidos de la misma especie (es decir, para evitar la homodimerización) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," Protein Eng. 13(8):583-588). Por lo tanto, la técnica ha enseñado la asociación no covalente de dichos polipéptidos (ver, por ejemplo, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Sin embargo, la técnica ha reconocido que los diacuerpos biespecíficos compuestos de polipéptidos asociados no covalentemente son inestables y se disocian fácilmente en monómeros no funcionales (ver, por ejemplo, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

A la vista de este desafío, la técnica ha tenido éxito en el desarrollo diacuerpos no mono-específicos heterodiméricos, unidos covalentemente estables, diacuerpos denominados **DART® (Reactivos de redireccionamiento de afinidad dual)**; ver, por ejemplo, Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nº 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea Nº EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT Nº WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; y Sloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells," PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. et al. (2015) "Targeting CD123 In AML Using A T-CellDirected Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform," Blood pii: blood-2014-05-575704; Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates," Sci. Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor 1b (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion," J. Mol. Biol. 399(3):436-449). Tales diacuerpos comprenden dos o más polipéptidos complejados covalentemente e implican manipular uno o más residuos de cisteína en cada una de las especies polipeptídicas empleadas que permiten que se formen enlaces disulfuro y de ese modo enlazar covalentemente dos cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, se ha demostrado que la adición de un residuo de cisteína al extremo C terminal de tales constructos permite el enlace de disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, estabilizando el heterodímero resultante sin interferir con las características de unión de la molécula bivalente.

Cada uno de los dos polipéptidos del diacuerpo **DART®** biespecífico más simple comprende tres dominios. El primer polipéptido comprende (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un primer dominio que comprende una

región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2), y (iii) un tercer dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y un dominio promotor de heterodímero que sirve para promover la heterodimerización con el segundo polipéptido del diacuerpo y unir covalentemente el primer y el segundo polipéptidos del diacuerpo entre sí. El segundo polipéptido contiene (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un tercer dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y un dominio promotor de heterodímero complementario que forma complejos con el dominio promotor de heterodímero de la primera cadena polipeptídica para promover la heterodimerización con la primera cadena polipeptídica. El residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) del tercer dominio de la segunda cadena polipeptídica sirve para promover el enlace covalente de la segunda cadena polipeptídica con la primera cadena polipeptídica del diacuerpo. Tales moléculas son estables, potentes y tienen la capacidad de unirse simultáneamente a dos o más antígenos. En un caso, los terceros dominios del primer y el segundo polipéptidos contienen cada uno un residuo de cisteína, la **Figura 1** proporciona un esquema de dicho diacuerpo, que utiliza dominios promotores de heterodímero de E-coil/K-coil y un conector que contiene cisteína para la unión covalente. Como se proporciona en la **Figura 2** y las **Figuras 3A-3C**, uno o ambos polipéptidos pueden poseer adicionalmente la secuencia de un dominio CH2-CH3, de tal manera que la formación de complejos entre los dos polipéptidos del diacuerpo forma una región Fc que es capaz de unirse al receptor Fc de las células (como los linfocitos B, células dendríticas, células asesinas naturales, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos). Como se proporciona con más detalle a continuación, no es necesario que los dominios CH2 y/o CH3 de tales cadenas polipeptídicas tengan idéntica secuencia, y ventajosamente se modifican para fomentar la formación de complejos entre las dos cadenas polipeptídicas.

Se han descrito muchas variaciones de tales moléculas (ver, por ejemplo, Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318; 2013/0295121; 2010/0174053 y 2009/0060910; Publicación de Patente Europea N° EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT N° WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Estos diacuerpos **DART®** que contienen la región Fc pueden comprender dos parejas de cadenas polipeptídicas. La primera cadena polipeptídica comprende (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de una primera inmunoglobulina (VL1), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de una segunda inmunoglobulina (VH2), (iii) un tercer dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y sirve para promover la heterodimerización con el segundo polipéptido del diacuerpo y para unir covalentemente el primer y el segundo polipéptidos del diacuerpo entre sí, y (iv) un dominio CH2-CH3. El segundo polipéptido contiene (en la dirección N-terminal a C-terminal): (i) un primer dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena ligera de la segunda inmunoglobulina (VL2), (ii) un segundo dominio que comprende una región de unión de un dominio variable de cadena pesada de la primera inmunoglobulina (VH1), y (iii) un tercer dominio que contiene un residuo de cisteína (o un dominio que contiene cisteína) y un dominio promotor de heterodímero que promueve la heterodimerización con la primera cadena polipeptídica. Aquí, los dos primeros polipéptidos forman un complejo entre sí para formar una región Fc. Las **Figuras 3A-3C** proporcionan esquemas de tres variaciones de tales diacuerpos usando diferentes dominios promotores de heterodímeros.

Otros diacuerpos **DART®** que contienen la región Fc pueden comprender tres cadenas polipeptídicas. El primer polipéptido de tales diacuerpos **DART®** contiene tres dominios: (i) un dominio que contiene VL1, (ii) un dominio que contiene VH2 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. El segundo polipéptido de tales diacuerpos **DART®** contiene: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena polipeptídica del diacuerpo. El tercer polipéptido de tales diacuerpos **DART®** comprende una secuencia CH2-CH3. Por tanto, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos **DART®** se asocian para formar un sitio de unión de VL1/VH1 que es capaz de unirse al epítipo, así como un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítipo. Tales moléculas de **DART®** más complejas también poseen dominios que contienen cisteína que funcionan para formar un complejo enlazado covalentemente. Por tanto, el primer y el segundo polipéptidos se unen entre sí mediante un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína en sus respectivos terceros dominios. En particular, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas forman complejos entre sí para formar una región Fc que se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Las **Figuras 4A-4B** proporcionan esquemas de tales diacuerpos que comprenden tres cadenas polipeptídicas.

Otros diacuerpos **DART®** que contienen la región Fc más pueden comprender cinco cadenas polipeptídicas que pueden comprender las regiones de unión de los dominios variables de cadena ligera y pesada de hasta tres inmunoglobulinas diferentes (a las que se hace referencia como VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3). Por ejemplo, la primera cadena polipeptídica de tales diacuerpos puede contener: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La segunda y quinta cadenas polipeptídicas de dichos diacuerpos pueden contener: (i) un dominio que contiene VL1 y (ii) un dominio que contiene

CL. La tercera cadena polipeptídica de tales diacuerpos puede contener: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CHI, (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3, (iv) un dominio que contiene VL2, (v) un dominio que contiene VH3 y (vi) un dominio promotor de heterodímeros, donde los dominios promotores de heterodímeros promueven la dimerización de la tercera cadena con la cuarta cadena. El cuarto polipéptido de tales diacuerpos puede contener: (i) un dominio que contiene VL3, (ii) un dominio que contiene VH2 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo. Aquí, el primer y el tercer polipéptidos forman un complejo entre sí para formar una región Fc. Tales moléculas DART® más complejas también poseen dominios que contienen cisteína que funcionan para formar un complejo unido covalentemente, de tal manera que cada cadena polipeptídica se une a por lo menos una cadena polipeptídica de adición a través de un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína. Preferiblemente, tales dominios se ordenan en la dirección N-terminal a C-terminal. La **Figura 5** proporciona esquemas de tales diacuerpos que comprenden cinco cadenas polipeptídicas.

Se conocen en la técnica constructos alternativos para aplicaciones en las que es deseable una molécula tetravalente pero no se requiere un Fc, incluyendo, pero no limitado a, anticuerpos en tándem tetravalentes, también denominados "**TandAbs**" (ver, por ejemplo Publicaciones de Patente de Estados Unidos N° 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2011-020667 2013-0189263; Publicaciones de Patente Europea N° EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 y EP 1293514; Publicaciones de PCT N° WO 1999/057150, WO 2003/025018, y WO 2013/013700) que se forman por la homodimerización de dos cadenas idénticas, cada una de las cuales posee un dominio VH1, VL2, VH2 y VL2.

Recientemente, se han descrito estructuras trivalentes que incorporan dos dominios de unión de tipo diacuerpo y un dominio de tipo no diacuerpo y una región Fc (ver, por ejemplo, Solicitud de PCT N°: PCT/US 15/33076, titulada "Tri-Specific Binding Molecules and Methods of Use Thereof", presentada el 29 de mayo de 2015; y PCT/US15/33081, titulada "Tri-Specific Binding Molecules That Specifically Bind to Multiple Cancer Antigens and Methods of Use Thereof", presentada el 29 de mayo de 2015). Tales moléculas trivalentes pueden utilizarse para generar moléculas monoespecíficas, biespecíficas o triespecíficas. Las **Figuras 6A-6F** proporcionan esquemas de tales moléculas trivalentes que comprenden 3 o 4 cadenas polipeptídicas.

IV. Las moléculas de unión a PD-1 antihumanas de la presente divulgación

Las moléculas de unión a PD-1 preferidas de la presente divulgación incluyen anticuerpos, diacuerpos, BiTE, etc. y son capaces de unirse a una porción (**epítipo**) continua o discontinua (por ejemplo, conformacional) de PD-1 humana (CD279). Las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación también mostrarán preferiblemente la capacidad de unirse a moléculas de PD-1 de una o más especies no humanas, en particular, especies de primates (y especialmente una especie de primates, como el mono cynomolgus). Un polipéptido de PD-1 humana representativo (Secuencia NCBI NP_005009.2; que incluye una secuencia señal de 20 residuos de aminoácidos (mostrada subrayada) y la proteína madura de 268 residuos de aminoácidos) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 68**):

MQIIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

En ciertos casos, las moléculas de unión a PD-1 antihumanas de la divulgación se caracterizan por cualquiera (uno o más) de los siguientes criterios:

- (1) se unen específicamente a la PD-1 humana tal como se expresa de forma endógena en la superficie de una célula T humana estimulada;
- (2) se unen específicamente a la PD-1 humana con una constante de unión en equilibrio (K_D) de 40 nM o menos;
- (3) se unen específicamente a PD-1 humana con una constante de unión en equilibrio (K_D) de 5 nM o menos;
- (4) se unen específicamente PD-1 humana con una constante de asociación (k_a) de $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ o más;
- (5) se unen específicamente PD-1 humana con una constante de asociación (k_a) de $90,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ o más;
- (6) se unen específicamente PD-1 humana con una constante de disociación (k_d) de $7 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ o menos;
- (7) se unen específicamente PD-1 humana con una constante de disociación (k_d) de $2 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ o menos;
- (8) se unen específicamente a PD-1 de primates no humanos (por ejemplo, PD-1 de mono cynomolgus);
- (9) inhiben (es decir, bloquean o interfieren con) la unión/actividad inhibidora del ligando de PD-1 (PD-L1/PD-L2) a PD-1;
- (10) estimulan una respuesta inmunitaria; y/o

(11) actúan en sinergia con un anticuerpo anti-LAG-3 humano para estimular una respuesta de células T específica de antígeno.

Como se usa aquí, el término "respuesta de células T específicas de antígeno" se refiere a respuestas de una célula T que resultan de la estimulación de la célula T con el antígeno para el cual la célula T es específica. Los ejemplos no limitativos de respuestas de una célula T tras la estimulación específica del antígeno incluyen la proliferación y producción de citoquinas (por ejemplo, producción de TNF- α , IFN- γ). La capacidad de una molécula para estimular una respuesta de células T específica de antígeno puede determinarse, por ejemplo, usando el ensayo de PBMC **estimulado** por el antígeno de enterotoxina tipo B de *Staphylococcus aureus* ("**SEB**") descrito en la presente.

Las moléculas de unión a PD-1 antihumanas preferidas de la presente divulgación poseen los dominios VH y/o VL de los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humana murinos "**PD-1 mAb 1**", "**PD-1 mAb 2**", "**PD-1 mAb 3**", "**PD-1 mAb 4**", "**PD-1 mAb 5**", "**PD-1 mAb 6**", "**PD-1 mAb 7**", "**PD-1 mAb 8**", "**PD-1 mAb 9**", "**PD-1 mAb 10**", "**PD-1 mAb 11**", "**PD-1 mAb 12**", "**PD-1 mAb 13**", "**PD-1 mAb 14**", o "**PD-1 mAb 15**", y más preferiblemente poseen 1, 2 o las 3 CDR_Hs del dominio VH y/o 1, 2 o las 3 CDR_Ls del dominio VL de tales anticuerpos monoclonales de PD-1 antihumanos. Tales moléculas de unión a PD-1 antihumanas preferidas incluyen anticuerpos biespecíficos (o multiespecíficos), anticuerpos quiméricos o humanizados, BiTe, diacuerpos, etc. y tales moléculas de unión tienen regiones Fc variantes.

La divulgación se refiere particularmente a moléculas de unión a PD-1 que comprenden un dominio de unión a PD-1 que posee:

(A)

- (1) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 1;
- (2) las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 1;
- (3) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 1 y las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 1;
- (4) el dominio VH de hPD-1 mAb 1 VH1;
- (5) el dominio VL de hPD-1 mAb 1 VL1;
- (6) los dominios VH y VL de hPD-1 mAb 1;

(B)

- (1) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 2;
- (2) las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 2;
- (3) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 2 y las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 2;
- (4) el dominio VH de hPD-1 mAb 2 VH1;
- (5) el dominio VL de hPD-1 mAb 2 VL1;
- (6) los dominios VH y VL de hPD-1 mAb 2;

(C)

- (1) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 3;
- (2) las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 3;
- (3) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 3 y las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 3;

(D)

- (1) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 4;
- (2) las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 4;
- (3) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 4 y las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 4;

(E)

- (1) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 5;
- (2) las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 5;
- (3) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 5 y las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 5;

(F)

- (1) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 6;
- (2) las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 6;
- (3) las tres CDR_Hs del dominio VH de PD-1 mAb 6 y las tres CDR_Ls del dominio VL de PD-1 mAb 6;

(G)

- 5 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 7;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 7, o hPD-1 mAb 7 VL2, o hPD-1 mAb 7 VL3;
 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 7 y las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 7, o hPD-1 mAb 7 VL2, hPD-1 mAb 7 VL3;
 (4) el dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1, o hPD-1 mAb 7 VH2;
 (5) el dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL1, o hPD-1 mAb 7 VL2, o hPD-1 mAb 7 VL 3;
 10 (6) los dominios VH y VL de hPD-1 mAb 7 (1.1), o hPD-1 mAb 7 (1.2), o hPD-1 mAb 7 (1.3), o hPD-1 mAb 7 (2.1), o hPD-1 mAb 7 (2.2), o hPD-1 mAb 7 (2.3);

(H)

- 15 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 8;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 8;
 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 8 y las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 8;

(I)

- 20 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 9, o hPD-1 mAb 9 VH2;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 9, o hPD-1 mAb 9 VL2;
 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 9, o hPD-1 mAb 9 VH2 y las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 9, o hPD-1 mAb 9 VL2;
 (4) el dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH1, o hPD-1 mAb 9 VH2;
 25 (5) el dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL1, o hPD-1 mAb 9 VL2;
 (6) los dominios VH y VL del hPD-1 mAb 9 (1.1), o hPD-1 mAb 9 (1.2), o hPD-1 mAb 9 (2.1), o hPD-1 mAb 9 (2.2);

(J)

- 30 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 10;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 10;
 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 10 y las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 10;

(K)

- 35 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 11;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 11;
 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 11 y las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 11;

(L)

- 40 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 12;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 12 de;
 45 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH del PD-1 mAb 12 y las tres CDR_{LS} del dominio VL del PD-1 mAb 12;

(M)

- 50 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 13;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 13;
 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 13 y las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 13;

(N)

- 55 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 14;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 14;
 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 14 y las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 14;

(O)

- 60 (1) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 15;
 (2) las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 15;
 (3) las tres CDR_{HS} del dominio VH de PD-1 mAb 15 y las tres CDR_{LS} del dominio VL de PD-1 mAb 15;
 (4) el dominio VH de hPD-1 mAb 15 VH1;
 65 (5) el dominio VL de hPD-1 mAb 15 VL1;

(6) los dominios VH y VL del mAb 15 de hPD-1;

o que se une, o compite por unirse con, el mismo epítipo que PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15.

A. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 1

1. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 1

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 69**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

DVQLQESGPG RVKPSQSLSL TCTVTGFSIT NDYAWNWIRQ FPGNKLEWMG
HITYSGSTSY NPSLKSRISI TRDTSKNHFF LQLSSVTPED TATYYCARDY
GSGYPYTLDY WGQGTSVTVS S

CDR_{H1} de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:71**): NDYAWN

CDR_{H2} de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:72**): HITYSGSTSYNPSLKS

CDR_{H3} de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO:73**): DYSGYPYTLDY

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 1 es **SEQ ID NO: 70** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac
 cttctcagtc tctgtccctc acctgcactg tcaactggctt ctcaatcacc
aatgattatg cctggaactg gatccgacag tttccaggaa acaaactgga
 gtggatgggc cacataacct acagtggcag cactagctac aaccatctc
tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa ccacttcttc
 ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc
 aagagattac ggtagtggct acccctatac tttggactac tgggggtcaag
 gtacctcagt caccgtctcc tcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 74**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

QIVLTQSPAL MSASPGEKVT MTCSATSIVS YVYWYQQKPG SSPQPWIYLT
SNLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SDNPYTFGGG
 TKLEIK

CDR_L 1 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 76**): SATSIVSYVY

CDR_L 2 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 77**): LTSNLAS

CDR_L 3 de PD-1 mAb 1 (**SEQ ID NO: 78**): QQWSDNPYT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 1 es la **SEQ ID NO: 75** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga
 gaaggtcacc atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact
 5 ggtaccagca gaagcctgga tcttcccccc aaccttgat ttatctcaca
tccaacctgg cttctggagt ccttgctcgc ttcagtggca gtgggtctgg
 gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa gatgctgcc
 10 cttattactg ccagcagtggt agtgataacc cgtacacgtt cggagggggg
 accaagctgg aaataaaa

2. Humanización del anticuerpo PD-1 antihumana PD-1 mAb 1 para formar "hPD-1 mAb 1"

15 El anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 1 se humanizó y se desinmunizó adicionalmente cuando se identificaron epítopos antigénicos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras administración a un receptor humano. La humanización produjo un dominio VH humanizado, designado en la presente como "hPD-1 mAb 1 VH1", y un dominio VL humanizado designado en la presente como "hPD-1 mAb 1 VL1". Por consiguiente, a un anticuerpo que comprende los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se hace referencia como "hPD-1 mAb 1".

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 1 VH1 (SEQ ID NO: 79) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

25 DVQLQESGPG LVKPSQTLST TCTVSGFSIS NDYAWNWIRQ PPGKGLEWIG
HITYSGSTSY NPSLKSRLLTI TRDTSKNQFV LTMTNMDPVD TATYYCARDY
GSGPYTLDY WGQGTTVTVS S

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 1 VH1 es la SEQ ID NO: 80 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

35 gacgtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac
 actgagcctg acttgccaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg
cctggaattg gattaggcag cctcccggta aagggtctga gtggatcggc
 40 cacatcacat acagcggctc cacatcatat aatcccagtc tgaagagccg
 tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttggt ctgaccatga
 ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgaggattat
ggttctgggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt
 45 gaccgtgagc tcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 1 VL1 (SEQ ID NO: 81) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

50 EIVLTQSPAT LSVSPGEKVT ITCSATSIVS YVYWYQQKPG QAPQPLIYLT
SNLASGIPAR FSGSGSGTDF TLTISSEAE DAATYYCQQW SDNPYTFGGG
 TKVEIK

55 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 1 VL1 es la SEQ ID NO: 82 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaaatcggtc tgaccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga
 aaaggtcacc attacttgct ctgctacttc tatcgtgtcc tacgtgtact
 5 ggtatcagca gaagcccggt caggctcccc agccattgat atatctgacc
agcaacctgg cttctggtat cccagctcgt ttttccggta gcgggtcagg
 gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa gacgccgcca
 10 cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcggtggc
 accaaagtcg aaataaag

B. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 2

15 1. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 2

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 83) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

20 DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY
ISSGMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLS
DYFDYWGQGT TLTVSS

25 CDR_H 1 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 85): SFGMH
 CDR_H 2 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 86): YISSGMSISYADTVKG
 CDR_H 3 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 87): LSDYFDY

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 2 es la SEQ ID NO: 84 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggggtc
 35 ccggaactc tctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa
tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcattac
atcagtagtg gcagtatgag catttcctat gcagacacag tgaagggccg
 40 attcacgctc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaataga
 ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 88) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

50 DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPK
 LLIYRVSNRF SGVPDRFGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FFCSQTTHVP
WTFGGGKLE IK

55 CDR_L 1 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 90): RSSQSLVHSTGNTYLH
 CDR_L 2 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 91): RVSNRFS
 CDR_L 3 de PD-1 mAb 2 (SEQ ID NO: 92): SQTTHVPWT

60 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 2 es la SEQ ID NO: 89 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
 tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gagccttggt cacagtactg
 5 gaaacaccta tttacattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag
 ctctgatct acagggtttc taaccgattt tctgggggtcc ccgacagggt
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agtagagtgg
 10 aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaactac acatgttccg
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 2 para formar "hPD-1 mAb 2"

15 El anticuerpo anti-PD-1 humana murino, PD-1 mAb 2, se humanizó y desinmunizó adicionalmente cuando se identificaron epítomos antigénicos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La humanización produjo un dominio VH humanizado, designado en la presente como "hPD-1 mAb 2 VH1", y un dominio VL humanizado designado en la presente como "hPD-1 mAb 1 VL1". Por consiguiente, cualquier anticuerpo que comprenda los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se denomina "hPD-1 mAb 2".

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 2 VH1 (SEQ ID NO: 93 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

25 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSGSMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTEG TALYYCASLS
DYFDYWGQGT TTVVSS

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 2 VH1 es la SEQ ID NO: 94 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

35 gaagtgcaat tggttgagag tgggtggtggc ctggtgcagc cagggtggaag
 tctgcggttg tctgtgtcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga
tgcattgggt ggcgcaggct cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac
 40 atctccagcg ggtccatgtc tattagttat gccgacacag tgaaaggcag
 gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac ctgcaaatga
 atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttccctgtct
 45 gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 2 VL1 (SEQ ID NO: 95 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

50 DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ
 LLIYRVSNRF SGVPDRFGSG GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTTHVP
WTFGQGTKLE IK

55 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 2 VL1 es la SEQ ID NO: 96 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

5 gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccttggggcca
 gccagccagt atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag
gaaatacata tctccattggg tacctgcaaa aaccagggca gagccccag
 ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt tctggcgtgc cagatcggtt
 cagcggcagc gggctctggca ctgatttcac actgaaaatc tctaggggtg
 10 aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc
tggacttttg gccaaaggtac taagctggaa atcaag

C. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 3

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 97) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

20 QVQLQQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFT DYVMHWVKQT PVHGLEWIGT
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TADKSSNTAY MELRSLTSED SAVYYFTREK
ITTIVEGTYW YFDVWGTGTT VTVSS

25 CDR_H 1 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 99): DYVMH
 CDR_H 2 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 100): TIDPETGGTAYNQKFKG
 CDR_H 3 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 101): EKITTIVEGTYWYFDV

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 3 es la SEQ ID NO: 98 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

30 caggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgagggc ctggggccttc
 agtgacgctg tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa
 35 tgcactgggt gaagcagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact
attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa
 ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac atggagctcc
 40 gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac
 agggaccacg gtcaccgtct cctca

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 102) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

50 DVLLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGDTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFGSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHLP
YTFGGGKLE IK

55 CDR_L 1 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 104): RSSQNIVHSNGDYLE
 CDR_L 2 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 105): KVSNRFS
 CDR_L 3 de PD-1 mAb 3 (SEQ ID NO: 106): FQGSHPYT

60 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 3 es la SEQ ID NO: 103 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatgttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagaga
 tcaagcctcc atctcttgc gatctagtca gaacattgta catagtaatg
 5 gagacaccta tttggaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag
 ctcttgatct ataaagtttc caaccgattt tctgggggtcc cagacagggt
 cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc agcagagtgg
 10 aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttccg
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa

D. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 4

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 107) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY
 20 ISSGMSISY ADTVKGRFTV TRDNAKNTLF LQMTSLRSED TAIYYCASLT
DYFDYWGQGT TLTVSS

25 CDR_H 1 de PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 109): SFGMH
 CDR_H 2 de PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 110): YISSGMSISYADTVKG
 CDR_H 3 de PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 111): LTDYFDY

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 4 es la SEQ ID NO: 108 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

30 gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc
 ccggaaactc tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa
 35 tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcattat
attagtagtg gcagtatgag tattttcctat gcagacacag tgaagggccg
 attcaccgtc accagagaca atgccaagaa caccctgttc ctgcaaataga
 40 ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgact
gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 112) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

45 DVVMSQTPLS LPVSLGDQAS ISRSSQSLV HSTGNTYFHW YLQKPGQSPK
 LLIYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQTTHVP
 50 WTFGGGTKLE IK

55 CDR_L 1 de PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 114): RSSQSLVHSTGNTYFH
 CDR_L 2 de PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 115): RVSNRFS
 CDR_L 3 de PD-1 mAb 4 (SEQ ID NO: 116): SQTTHVPWT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 4 es la SEQ ID NO: 113 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
 tcaagcctcc atctcctgca gatctagtca gagccttggt cacagtactg
 5 gaaacaccta tttccattgg tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag
 ctcttgatct acaggggttc taaccgattt tctgggggtcc ccgacagggt
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
 10 aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

E. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 5

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 117) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

QVQLQQPGVE LVRPGASVKL SCKASGYSFT AYWMNWMKQR PGQGLEWIGV
 20 IHPDSETWL NQKFDKATL TVDKSSSTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH
YGSSPFAYWG QGTLVTVSA

25 CDR_H 1 de PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 119): AYWMN
 CDR_H 2 de PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 120): VIHPDSETWLNQKF
 CDR_H 3 de PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 121): EHYGSSPFAY

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 5 es la SEQ ID NO: 118 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

caggtccaac tgcagcagcc tgggggttgaa ctggtgaggc ctggagcttc
 agtgaagctg tcttgcaagg cttctggcta ctcttcacc gcctactgga
 35 tgaactggat gaaacagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg
attcatcctt ccgatagtga aacttggtta aatcagaagt tcaaggacaa
 ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac atgcaactca
 tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagcac
 40 tacggtagta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt
 ctctgca

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 122) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 50 LIYAASNQGS GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDTAMY FCQQSKEVPY
TFGGGTKLEI K

55 CDR_L 1 de PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 124): RANESVDNYGMSFMN
 CDR_L 2 de PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 125): AASNQGS
 CDR_L 3 de PD-1 mAb 5 (SEQ ID NO: 126): QQSKEVPY

60 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 5 es la SEQ ID NO: 123 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

5 gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca
tgagttttat gaactgggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccagggttag
 10 tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat cctatggagg
 aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac
acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaa

F. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 6

15 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 127) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

20 EVKLVESGGG LVNPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PEKRLEWVAT
ISGGGSDTYYPDSVKGRFTI SRDNAKNNLY LQMSSLRSED TALYYCAROK
ATTWFAYWGQ GTLTVTST

25 CDR_H 1 de PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 129): SYGMS
 CDR_H 2 de PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 130): TISGGGSDTYYPDSVKG
 CDR_H 3 de PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 131): QKATTWFAY

30 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 6 es la SEQ ID NO: 128 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

30 gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga
 acgtgccact ctacgtgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca
 35 tgctccttcat gaactgggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
 ctcatccacg ccgcctctaa ccgcggatct ggggtgcctt cacgtttttc
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
 40 cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat
acttttgggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 132) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

45 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRRASESVD NYGISFMNWF QQKPGQPPKL
 LIYPASNQGS GVPARFSGSG SGTDFSLNIH PMEEDDAAMY FCQQSKEVPW
 50 TFGGGTKLEI K

55 CDR_L 1 de PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 134): RASESVDNYGISFMN
 CDR_L 2 de PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 135): PASNQGS
 CDR_L 3 de PD-1 mAb 6 (SEQ ID NO: 136): QQSKEVPWT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 6 es la SEQ ID NO: 133 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

60 gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca
ttagttttat gaactgggttc caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 65 ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccagggttag

tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg
 aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg
 5 acgttcgggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa

G. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7

1. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 7

10 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 137**)
 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

15 QVQLQQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYSFT SYWMNWVKQR PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDKATL TVDKSSTTAY MQLISPTSED SAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

20 CDR_H 1 de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 139**): SYWMN
 CDR_H 2 de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 140**): VIHPDSETWLDQKFKD
 CDR_H 3 de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 141**): EHYGTSPFAY

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 7 es la **SEQ ID NO: 138** (los
 nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

30 gaggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgagggc ctggagcttc
 agtgaagctg tcttgaagg cttctggcta ctcttcacc agctactgga
tgaactgggt gaagcagagg cctggacaag gccttgagtg gattggcgtg
attcatcctt ccgatagtga aacttggtta gatcagaagt tcaaggacaa
 ggccacattg actgtagaca aatcctccac cacagcctac atgcaactca
 35 tcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagggagcac
tacgggtacta gcccgtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt
 gtcttcc

40 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 142**)
 (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

45 DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPARFSGSG FGTD¹FSLN¹IH PMEEDDAAMY FCQQSKEVPY
TFGGGTKLEI K

50 CDR_L 1 de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 144**): RANESVDNYGMSFMN
 CDR_L 2 de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 145**): AASNQGS
 CDR_L 3 de PD-1 mAb 7 (**SEQ ID NO: 146**): QQSKEVPYT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 7 es la **SEQ ID NO: 143** (los
 nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

55 gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca
 gagggccacc atctctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca
tgagttttat gaactgggtc caacagaaac caggacagcc acccaaactc
 60 ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc ggggtccctg ccaggtttag
 tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat cctatggagg
 aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac
 65 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa

2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7 para formar "hPD-1 mAb 7"

El anticuerpo murino anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7 se humanizó y se desinmunizó adicionalmente cuando se identificaron epítopos antigénicos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La humanización produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como "hPD-1 mAb 7 VH1" y "hPD-1 mAb 7 VH2", y tres dominios VL humanizados designados en la presente como "hPD-1 mAb 7 VL1", "hPD-1 mAb 7 VL2", y "hPD-1 mAb 7 VL3". Cualquiera de los dominios VL humanizados puede emparejarse con cualquiera de los dominios VH humanizados. En consecuencia, a cualquier anticuerpo que comprenda uno de los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se hace referencia genéricamente como "hPD-1 mAb 7", y a las combinaciones particulares de dominios VH/VL humanizados se hace referencia por referencia como dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hPD-1 mAb 7 VH1 y hPD-1 mAb 7 VL2 se hace referencia específicamente como "hPD-1 mAb 7 (1.2)".

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1 (SEQ ID NO: 147) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VH1 es la SEQ ID NO: 148 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

caagttcaat tggtagacagag cggggcagag gtgaagaaac cgggcgccag
tggttaaggtg tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga
tgaattgggt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg gattggggtg
atacatcctt ctgacagcga aacatgggtt gaccagaaat ttaaagatcg
tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct
ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt
atcctcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH2 (SEQ ID NO: 149) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWAGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VH2 es la SEQ ID NO: 150 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

caagttcaat tggtagacagag cggggcagag gtgaagaaac cgggcgccag
tggttaaggtg tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga
tgaattgggt gcgtcaagca ccagggcagg gtctggaatg ggctggggtg
atacatcctt ctgacagcga aacatgggtt gaccagaaat ttaaagatcg
tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac atggaactct
ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac
tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaactc tcgtaaccgt
atcctcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL1 (**SEQ ID NO: 151**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

5 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRANESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI K

10 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VL1 es la **SEQ ID NO: 152** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga
 acgtgccact ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca
 15 tgtccttcat gaactgggtt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
 ctcattccacg ccgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgtttttc
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
 20 cagaggactt tgccgtctat ttctgcccagc aatctaaaga ggtgccctat
acttttgggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

25 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL2 (**SEQ ID NO: 153**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

30 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI K

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VL2 es la **SEQ ID NO: 154** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

35 gaaatcgtac tcaccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga
 acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca
 40 tgtccttcat gaactgggtt cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg
 ctcattccacg ccgcctctaa ccagggatct ggggtgcctt cacgtttttc
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
 cagaggactt tgccgtctat ttctgcccagc aatctaaaga ggtgccctat
 45 acttttgggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL3 (**SEQ ID NO: 155**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

50 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAAASNRGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI K

55 Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 7 VL3 es la **SEQ ID NO: 156** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga
 acgtgccact ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca
 5 tgtccttcat gaactgggttt cagcagaagc ctgggcagcc acctaaagctg
 ctcattccacg ccgcctctaa ccgcggatct ggggtgcctt cacgtttttc
 tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc tctctggagc
 cagaggactt tgccgtctat ttctgc cagc aatctaaaga ggtgccctat
 10 acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa

La CDR_L 1 del dominio VL de ambos hPD-1 mAb 7 VL2 y hPD-1 mAb 7 VL3 comprende una sustitución de
 15 aminoácidos de asparagina a serina y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos:
 RASEVDNYGMSFMN ((SEQ ID NO: 157), la serina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda
 incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios PD-1 mAb 7 CDR_L 1 descritos anteriormente.

Además, la CDR_L2 del dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL3 comprende una sustitución de aminoácidos de
 20 glutamina a arginina y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: AASNRGS ((SEQ ID NO: 158),
 la arginina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en
 cualquiera de los dominios PD-1 mAb 7 CDR_L2 descritos anteriormente.

H. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 8

25 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO: 159)
 (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

EGQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DYYMNWVKQN HGKSLEWIGD
 30 INPKNGDTHY NQKFKGEATL TVDKSSTTAY MELRSLTSED SAVYYCASDF
DYWGQGTTLT VSS

35 CDR_H1 de PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO: 161): DYYMN
 CDR_H2 de PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO: 162): DINPKNGDTHYNQKFKG
 CDR_H3 de PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO: 163): DFDY

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 8 es la SEQ ID NO: 160 (los
 40 nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggccttc
 agtgaagata tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca
 45 tgaactgggt gaagcagaac catggaaaga gccttgagtg gattggagat
attaatccta aaaatggtga cactcactac aaccagaagt tcaagggcga
 ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac atggagctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagc gattttt
 50 gactactggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO: 164)
 55 (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DVVMQTPLS LPVGLGDQAS ISCRSSQTLV YSNGNTYLNW FLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFGSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
 60 FTFGSGTKLE IK

CDR_L1 de PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO: 166): RSSQTLVYSNGNTYLN
 CDR_L2 de PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO: 167): KVSNRFS
 65 CDR_L3 de PD-1 mAb 8 (SEQ ID NO: 168): SQSTHVPFT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 8 es la **SEQ ID NO: 165** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

5 gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga
tcaagcctcc atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg
gaaacaccta tttaaattgg ttcttgcaga agccaggcca gtctccaaag
10 ctcttgatct acaagtttc caaccgattt tctgggggtcc cagacagggt
cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
aggctgagga tctggggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa

I. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 9

1. Anticuerpo PD-1 antihumano murino PD-1 mAb 9

20 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 169**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

25 EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQT PEKRLEWVAT
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQISSLRSED TALYYCARYY
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

30 CDR_H1 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 171**): SYLVS
CDR_H2 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 172**): TISGGGGNTYYSDSVKG
CDR_H3 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 173**): YGFDGAWFAY

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 9 es la **SEQ ID NO: 170** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

35 gaagtgatgc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc
cctgaaactc tctgtgtcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg
40 tgtcttgggt tgcgcagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc
attagtgggtg gtggtggtaa cacctactat tcagacagtg tgaagggtcg
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaataca
45 gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggtatggt
ttcgacggcg cctgggttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt
ctcttcc

50 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 174**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

55 DIQMTQSPAS LSASVGDIVT ITCRASENIY SYLAWYQQKQ EKSPQLLVYN
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTQ FSLTINSLQP EDFGNYYCQH HYAVPWTFGG
GTRLEIT

60 CDR_L1 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 176**): RASENIYSYLA
CDR_L2 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 177**): NAKTLAA
CDR_L3 de PD-1 mAb 9 (**SEQ ID NO: 178**): QHHYAVPWT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 9 es la **SEQ ID NO: 175** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

65

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga
 tattgtcacc atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agttatttag
 5 catgggtatca gcagaaacag gaaaaatctc ctcagctcct ggtctataaat
gcaaaaacct tggcagcagg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc
 aggcacacag ttttctctga ccatcaacag cctgcagcct gaagattttg
 10 ggaattatta ctgtcagcat cattatgctg ttccgtggac gttcgggtgga
 ggcaccagac tggaaatcac a

2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 9 para formar "hPD-1 mAb 9"

15 El anticuerpo murino anti-PD-1 humana PD-1 mAb 9 anteriormente descrito se humanizó y se desinmunizó
 adicionalmente cuando se identificaron epitopos antigénicos para demostrar la capacidad de humanizar un
 anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La
 humanización produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como "hPD-1 mAb 9 VH1" y
 20 "hPD-1 mAb 9 VH2", y dos dominios VL humanizados designados en la presente como "hPD-1 mAb 9 VL1" y
 "hPD-1 mAb 9 VL2". Cualquiera de los dominios VL humanizados puede emparejarse con los dominios VH
 humanizados. Por consiguiente, a cualquier anticuerpo que comprenda uno de los dominios VL humanizados
 emparejados con el dominio VH humanizado se hacer referencia genéricamente como "hPD-1 mAb 9" y a
 combinaciones particulares de dominios VH/VL humanizados se hace referencia como dominios VH/VL específicos,
 25 por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hPD-1 mAb 9 VH1 y hPD-1 mAb 9 VL2 se hace referencia
 es específicamente como "hPD-1 mAb 9 (1.2)".

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH1 (SEQ ID NO:
 179) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

30 EVQLVESGGG LVRPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVSWVRQA PGKGLEWVAT
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARYG
 35 FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 9 VH1 es la SEQ ID NO: 180 (los nucleótidos que
 codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

40 gaggtgcagc tgggtggaaag tgggggcggc ctggtgcgac cccgggggaag
 tctgaaactg tcttgtgcag catcaggatt tacttttttca tcttatctcg
tgtcttgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg ggtggccact
 45 atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaagggaag
 atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga
 actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga
 50 tttgacggcg catggtttgc ctacttgggga cagggcacat tggtaaccgt
 tagctcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH2 (SEQ ID NO:
 181) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

55 EVQLVESGGG LARPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVGWVRQA PGKGLEWTAT
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSARAED TATYYCARYG
 60 FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 9 VH2 es la SEQ ID NO: 182 (los nucleótidos que
 codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

65

gaggtgcagc tgggtggaaag tggggggcggc ctggcgcgcac ccggggggaag
 tctgaaactg tctgtgtcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg
 5 tgggctgggt aagacaagca cccggaaaag gcttggaatg gacggccact
atctccggtg gaggtggcaa cacctactat agcgacagtg tcaaggggaag
 atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac ctccagatga
 10 actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga
tttgacggcg catggtttgc ctacttgggga cagggcacat tggtaaccgt
 tagctcc

La CDR_H1 del dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH2 comprende una sustitución de aminoácidos de serina a glicina y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: SYLVG ((SEQ ID NO: 183), la glicina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios de CDR_H1 de PD-1 mAb 9 descritos anteriormente.

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL1 (SEQ ID NO: 184) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY SYLAWYQQKP GKAPKLLIYN
 25 AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
 GTKLEIK

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 9 VL1 es la SEQ ID NO: 185 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga
 30 tcgggtcacc atcacctgc c gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg
ccttggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttacaac
 35 gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaaagt aggttctcag gcagcggctc
 agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg
 ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa
 40 ggcactaagc tcgagatcaa a

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2 (SEQ ID NO: 186) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY NYLAWYQQKP GKAPKLLIYD
 45 AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
 GTKLEIK

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 9 VL2 es la SEQ ID NO: 187 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga
 55 tcgggtcacc atcacctgc c gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg
ccttggtatca acagaaacct ggtaaagccc caaaattgct catttacgac
 60 gccaagaccc tcgcagctgg cgtgccaaagt aggttctcag gcagcggctc
 agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc gaggattttg
 ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa
 ggcactaagc tcgagatcaa a

La CDR_L1 del dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2 comprende una sustitución de aminoácidos de serina a

asparagina y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: RASENIYNYLA (**SEQ ID NO: 188**), la asparagina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios de CDR_L de 1PD-1 mAb 9 descritos anteriormente.

5 La CDR_{L2} del dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2 comprende una sustitución de aminoácidos de asparagina a aspartato y tiene a continuación se muestra la secuencia de aminoácidos: DAKTLAA (**SEQ ID NO: 189**), el aspartato sustituido se muestra subrayado). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios de CDR_{L2} de PD-1 mAb 7 descritos anteriormente.

10 J. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 10

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 190**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

15 EVILVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYLMSWVRQT PEKRLEWVAS
ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRSED TALYYCARQE
LAFDYWGQGT TLTVSS

20 CDR_{H1} de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 192**): NYLMS
 CDR_{H2} de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 193**): SISGGGSNIYYPDSVKG
 CDR_{H3} de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 194**): QELAFDY

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 10 es la **SEQ ID NO: 191** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaagtgatac tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggaggggtc
 cctgaaactc tctgtgagc cctctggatt cactttcagt aactatctca
 30 tgtcttgggt tgcgcagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaagt
attagtgggtg gtggtagtaa tatctactat ccagacagtg tgaagggtcg
 attcaccata tccagggaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaata
 35 acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagaa
ctggccttttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctcc

40 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 195**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRTSQDIS NFLNWYQQKP DGTIKLLIYY
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GSTLPWTFGG
 45 GTKLEII

50 CDR_{L1} de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 197**): RTSQDISNFLN
 CDR_{L2} de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 198**): YTSRLHS
 CDR_{L3} de PD-1 mAb 10 (**SEQ ID NO: 199**): QQGSTLPWT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 10 es la **SEQ ID NO: 196** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

55 gatataccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga
 cagagtcacc atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aatttttttaa
actgggtatca gcagaaacca gatggaacta ttaaactcct gatctacttac
acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtggggtc
 60 tggaaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa gaagatattg
 ccacttactt ttgccaacag ggtagtagcg ttccgtggac gttcgggtgga
 ggcaccaagc tggaaatcat a

65

K. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 11

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 200**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

EVQLQQSGTV LARPGASVKM SCKTSGYTFT GYWMHWVKQR PGQGLKWMGA
IYPGNSDTHY NQKFKGKAKL TAVTSASTAY MELSSLTNEI SAIYYCTTGT
YSYFDVWGTG TTVTSS

CDR_{H1} de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 202**): GYWMH
 CDR_{H2} de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 203**): AIYPGNSDTHYNQKFKG
 CDR_{H3} de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 204**): GTYSYFDV

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 11 es la **SEQ ID NO: 201** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggccttc
 agtgaagatg tcttgcaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga
tgcactgggt aaaacagagg cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct
atttatcctg gaaatagtga tactcactac aaccagaagt tcaagggcaa
 ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac atggagctca
 gcagcctgac aatgaggac tctgcatct attactgtac tactgggacc
tactcgtact tcatgtcttg gggcacagg accacggtca ccgtctctc a

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 205**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQHRT NGSPRLLIKY
ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLTINSVES EDIADYYCQQ SNSWLTFGAG
 TKLELK

CDR_{L1} de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 207**): RASQSIGTSIH
 CDR_{L2} de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 208**): YASESIS
 CDR_{L3} de PD-1 mAb 11 (**SEQ ID NO: 209**): QQSNSWLT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 11 es la **SEQ ID NO: 206** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga
 aagagtcagt ttctcctgca a gggccagtca gagcattggc acaagcatac
actggtatca gcacagaaca aatgggtctc caaggcttct cataaagttat
gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc aggttttagtg gcagtggatc
 agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct gaagatattg
 cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cgggtgctggg
 accaagctgg agctgaaa

L. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 12

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 12 (**SEQ ID NO: 210**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

QGH LQ QSGAE LVRPGASVTL SCKASGFTFT DYEMHWVKQT PVHGLEWIGT
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TVDKSSTTTY MELRSLTSED SAVFYCSRER
ITTVVEGAYW YFDVWGTGTT VTVSS

CDR_H1 de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 212): DYEMH
 CDR_H2 de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 213): TIDPETGGTAYNQKFKG
 CDR_H3 de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 214): ERITTVVEGAYWYFDV

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 12 es la **SEQ ID NO: 211** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

cagggtcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggccttc
 agtgacgctg tcctgcaagg ctctgggctt cacatttact gactatgaga
tgcactgggt gaaacagaca cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact
attgatcctg aaactggtgg tactgcctac aatcagaagt tcaagggcaa
 ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac atggagctcc
 gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg
attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctgggggcac
 agggaccacg gtcaccgtct cctca

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 4 (**SEQ ID NO: 215**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DVLM TQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLICKKVSTRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP
YTFGGGKLE IK

CDR_L1 de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 217): RSSQNIVHSNGNTYLE
 CDR_L2 de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 218): KVSTRFS
 CDR_L3 de PD-1 mAb 12 (SEQ ID NO: 219): FQGSHPYT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 12 es la **SEQ ID NO: 216** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gatgttttga tgaccacagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga
 tcaagcctcc atctcttgca a gatctagtca gaacattgta catagtaatg
gaaacaccta tttagaatgg tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag
 ctctgatct gcaaaagtttc cacccgattt tctgggggtcc cagacaggtt
 cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc agcagagtgg
 aggctgagga tctgggaggtt tattattgct ttcaaggttc acatgttccg
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa

M. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 13

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 13 (**SEQ ID NO: 220**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SHTMSWVRQT PEKRLEWVAT
ISGGGSNIYY PDSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCARQA
YYGNYWYFDV WGTGTTVTVS S

CDR_H1 de PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO: 222): SHTMS
 CDR_H2 de PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO: 223): TISGGGSNIYYPDSVKG
 CDR_H3 de PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO: 224): QAYYGNWYFDV

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 13 es la **SEQ ID NO: 221** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaagtgatgc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggaggggc
 cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca
tgtcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc
attagtggtg gtggttctaa tatctactat ccagacagtg tgaagggctg
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac ctgcaaataga
 gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct
tactacggta attactggta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt
 caccgtctcc tcc

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO: 225) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIQMTQSPAT QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKSPQLLIYA
ATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSKISLQA EDFVSYYCQQ LDSIPWTFGG
 GTKLEIK

CDR_L1 de PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO: 227): LASQTIGTWLA
 CDR_L2 de PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO: 228): AATSLAD
 CDR_L3 de PD-1 mAb 13 (SEQ ID NO: 229): QQLDSIPWT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 13 es la **SEQ ID NO: 226** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacattcaga tgaccagtc tcctgccacc cagtctgcat ctctgggaga
 aagtgtcacc atcacgtgc c tggcaagtca gaccattggt acatggttag
catgggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctcagctcct gatttatgct
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc
 tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg
 taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcggtgga
 ggcaccaagc tggaaatcaa a

N. Anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 14

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO: 230) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYNFI SYWITWVKQR PGQGLQWIGN
IYPGTDGTTY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MHLRLTSED SAVYYCATGL
HWYFDVWGTG TTVTVSS

CDR_H1 de PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO: 232): SYWIT
 CDR_H2 de PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO: 233): NIYPGTDGTTYNEKFKS
 CDR_H3 de PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO: 234): GLHWYFDV

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 14 es la **SEQ ID NO: 231** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

5 caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc
 agtgaagatg tcttgcaagg cttctggcta caacttcac agctactgga
taacctgggt gaaacagagg cctggacaag gccttcagtg gattggaaat
atttatcctg gtactgatgg tactacctac aatgagaagt tcaagagcaa
 ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac atgcacctca
 10 gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta
cactgggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctctc c

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 14 (**SEQ ID NO: 235**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

15 DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTKASQSVG TNVAWYQQKP GQSPKALIYS
ASSRFSGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNSYPYTFGG
 20 GTKLEIK

CDR _L 1 de PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO: 237):	KASQSVGTNVA
CDR _L 2 de PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO: 238):	SASSRFS
CDR _L 3 de PD-1 mAb 14 (SEQ ID NO: 239):	QQYNSYPYT

25 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 14 es la **SEQ ID NO: 236** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

30 gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga
 cagggctcagt gtcacctgca a aggccagtc gagtgtgggt actaatgtag
cctgggtatca acagaagccc ggtcaatctc ctaaagcact gatttacttcg
gcatcctccc gattcagtgg cgtccctgat cgcttcacag gcagtggatc
 35 tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagttc gaagacttgg
 cagagtatct ctgt cagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg
 gggaccaagc tggaaataaa a

40 O. El anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 15

1. Anticuerpo murino anti-PD-1 humana PD-1 mAb 15

45 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de PD-1 mAb 15 (**SEQ ID NO: 240**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

50 EVMLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFIFS SYLISWVRQT PEKRLEWVAA
ISGGGADTYY ADSVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSSLRSED TALYYCTRRG
TYAMDYWGQG TSVTVSS

CDR _H 1 de PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO: 242):	SYLIS
CDR _H 2 de PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO: 243):	AISGGGADTYADSVKG
CDR _H 3 de PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO: 244):	RGTYAMDY

55 Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VH de PD-1 mAb 15 es la **SEQ ID NO: 241** (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaagtgatgc tgggtggagtc tggggggagggc ttagtgaagc ctggaggggtc
 cctgaaactc tctgtgagc cctctggatt cattttcagt agctatctca
 5 tctcttgggt tcgccagact ccggagaaga ggctggagtg ggtcgctgcc
attagtgggtg gtgggtgctga cacctactat gccgacagtg tgaaggggtc
 attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat ctgcaaatga
 10 gcagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg
acctatgcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtca ccgtctctc c

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO: 245) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIQMTQSPAS QSASLGESVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKSPQLLIYA
ATSLADGVPS RFSGSGSGTK FSKISSLQA EDFVNYYCQQ LYSIPWTFGG
 20 GTKLEIK

CDR _L 1 de PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO: 247):	LASQTIGTWLA
CDR _L 2 de PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO: 248):	AATSLAD
CDR _L 3 de PD-1 mAb 15 (SEQ ID NO: 249):	QQLYSIPWT

Un polinucleótido ejemplar que codifica el dominio VL de PD-1 mAb 15 es la SEQ ID NO: 246 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

gacattcaga tgaccagtc tcccgctcc cagtctgcat ctctgggaga
 30 aagtgtcacc atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatgggttag
catgggtatca gcagaaacca gggaaatctc ctgagctcct gatttatgct
gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca aggttcagtg gtagtggatc
 35 tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct gaagattttg
 taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcggtgga
 ggcaccaagc tggaaatcaa a

2. Humanización del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 15 para formar "hPD-1 mAb 15"

El anticuerpo anti-PD-1 humana murino PD-1 mAb 15 descrito anteriormente se humanizó y se desinmunizó adicionalmente cuando se identificaron epítopos antigénicos para demostrar la capacidad de humanizar un anticuerpo anti-PD-1 humana para disminuir su antigenicidad tras la administración a un receptor humano. La humanización produjo un dominio VH humanizado, designado en la presente como "hPD-1 mAb 2 VH1", y un dominio VL humanizado designado en la presente como "hPD-1 mAb 1 VL1". A un anticuerpo que comprende el dominio VL humanizado emparejado con el dominio VH humanizado se hace referencia como "hPD-1 mAb 15".

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 15 VH1 (SEQ ID NO: 250) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA
ISGGGADTTY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG
 55 TYAMDYWGQG TLVTVSS

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 15 VH1 es la SEQ ID NO: 251 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gaagtgcaac tgggtgaaag tggcggcggg ctggtgcggc caggtggttc
 actcagactg tcttgtgcag cttcaggctt tacattctcc tcttatctta
 5 tctcttgggt ggcgaagcc ccaggtaagg gccttgaatg ggtcgccgcc
attagtgggg gtggtgccga tacatattat gccgacagcg tcaagggacg
 tttcaccatc agcagggaca acgccaagaa tagcctttac ctgcagatga
 actcacttag agctgaagac accgctactt attactgtgc ccggcgcggg
 10 acttacgcta tggactattg gggccagggc accttgggtca ctgtctcatc c

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hPD-1 mAb 15 VL1 (SEQ ID NO: 252) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASQTIG TWLAWYQQKP GKAPKLLIYA
 20 ATSLADGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDFATYYCQQ LYSIPWTFGQ
 GTKLEIK

Un polinucleótido ejemplar que codifica hPD-1 mAb 15 VL1 es la SEQ ID NO: 253 (los nucleótidos que codifican los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

gatatccaga tgaccagtc tcccagctct ctcagtgcaa gcgtaggcga
 ccgtgtgacc atcacctgtc tggccagtca gaccattgga acctggctcg
 25 cctgggtatca gcagaaacct ggcaaggccc ctaagctgct gatttacgcc
 30 gccacctccc tcgcagatgg agtgccctcc cgatttagcg ggtccgggtc
 cggcaccgac ttcacattca caatcagcag cctccagccc gaggatttcg
 ctacatacta ctgtcaacag ctctactcca ttccatggac ctttgggtcag
 35 ggtactaaac tggagatcaa a

V. Anticuerpos anti-PD-1 humana PD-1 mAb 1-15, y sus derivados que tienen una región Fc modificada

En la función inmune tradicional, la interacción de los complejos anticuerpo-antígeno con las células del sistema inmunitario da como resultado una amplia variedad de respuestas, que varían desde funciones efectoras como la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, desgranulación de mastocitos y fagocitosis hasta señales inmunomoduladoras como la regulación de la proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician mediante la unión de la región Fc de anticuerpos o complejos inmunes a receptores de superficie celular especializados en células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares desencadenadas por anticuerpos y complejos inmunitarios resulta de la heterogeneidad estructural de los tres receptores Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIII (CD16) son receptores de activación (es decir, mejora del sistema inmunitario); FcγRIIB (CD32B) es un receptor inhibitor (es decir, amortiguador del sistema inmunitario). Además, la interacción con el receptor de Fc neonatal (FcRn) media el reciclaje de moléculas de IgG desde el endosoma a la superficie celular y su liberación a la sangre. La secuencia de aminoácidos de IgG1 de tipo salvaje ejemplar (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 2), IgG3 (SEQ ID NO: 3) e IgG4 (SEQ ID NO: 4) se han presentado anteriormente.

La modificación de la región Fc lleva normalmente a un fenotipo alterado, por ejemplo, vida media en suero alterada, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada a las enzimas celulares o función efectora alterada. Puede ser deseable modificar un anticuerpo u otra molécula de unión de la presente divulgación con respecto a la función efectora, por ejemplo, para mejorar la eficacia de dicha molécula en el tratamiento del cáncer. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en ciertos casos, por ejemplo en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica el bloqueo o antagonismo, pero no la muerte de las células que portan un antígeno objetivo. La función efectora aumentada es generalmente deseable cuando se dirige a células indeseables, como células tumorales y extrañas, donde los FcγR se expresan a niveles bajos, por ejemplo, células B específicas de tumores con niveles bajos de FcγRIIB (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, CLL y linfoma de Burkitt). En dichos casos, las moléculas de la divulgación con actividad de función efectora conferida o alterada son útiles para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección donde se desea una eficacia mejorada de la actividad de la función efectora.

65

En ciertos casos, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc que posee una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones o inserciones) en la secuencia de aminoácidos de una región Fc de tipo salvaje (por ejemplo, **SEQ ID NO: 1**), que reducen la afinidad y la aidez de la Región Fc y, por tanto, la molécula de la divulgación, por uno o más receptores FcγR. En otros casos, las moléculas de la divulgación comprenden una región Fc que posee una o más modificaciones de los aminoácidos de la región Fc de tipo salvaje, que aumentan la afinidad y la aidez de la región Fc y, por tanto, sw la molécula de la divulgación, para uno o más receptores FcγR. En otros casos, las moléculas comprenden una región Fc variante en donde dicha variante confiere o media una actividad aumentada de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o una unión aumentada a FcγRIIA, con respecto a una molécula que no comprende región Fc o que comprende una región Fc de tipo salvaje. En casos alternativos, las moléculas comprenden una región Fc variante en donde dicha variante confiere o media una actividad de ADCC disminuida (u otra función efectora) y/o una unión aumentada a FcγRIIB, con respecto a una molécula que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo salvaje. En algunos casos, la divulgación abarca moléculas de unión a PD-1 que comprenden una región Fc variante, tal región Fc variante no muestra una unión detectable a ningún FcγR, con respecto a una molécula comparable que comprende la Región Fc de tipo salvaje. En otros casos, la divulgación abarca moléculas de unión a PD-1 que comprenden una región Fc variante, cuya región Fc variante solo se une a un único FcγR, preferiblemente uno de FcγRIIA, FcγRIIB o FcγRIIIA. Cualquiera de tal afinidad y/o aidez aumentada se evalúa preferiblemente midiendo *in vitro* el grado de unión detectable a FcγR o la actividad relacionada con FcγR en células que expresan niveles bajos de FcγR cuando la actividad de unión de la molécula original (sin la región Fc modificada) no puede detectarse en las células, o en células que expresan antígenos objetivo del receptor no FcγR a una densidad de 30.000 a 20.000 moléculas/célula, a una densidad de 20.000 a 10.000 moléculas/célula, a una densidad de 10.000 a 5.000 moléculas/célula, a una densidad de 5.000 a 1.000 moléculas/célula, a una densidad de 1000 a 200 moléculas/célula o a una densidad de 200 moléculas/célula o menos (pero por lo menos 10, 50, 100 o 150 moléculas/célula).

Las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación pueden comprender una región Fc variante que tiene afinidades alteradas por un receptor Fcγ activador y/o inhibidor. En un caso, la molécula de unión a PD-1 comprende una región Fc variante que tiene afinidad aumentada para FcγRIIB y afinidad disminuida para FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. En otro caso, la molécula de unión a PD-1 de la presente divulgación comprende una región Fc variante, que tiene afinidad disminuida por FcγRIIB y afinidad aumentada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. En otro caso más, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc variante que tiene afinidad disminuida por FcγRIIB y afinidad disminuida por FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje. En otro caso más, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc variante, que tiene una afinidad sin cambios para FcγRIIB y una afinidad disminuida (o aumentada) para FcγRIIIA y/o FcγRIIA, con respecto a una molécula comparable con una región Fc de tipo salvaje.

En ciertos casos, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc variante que tiene una afinidad alterada por FcγRIIIA y/o FcγRIIA de tal manera que la inmunoglobulina tiene una función efectora mejorada. Los ejemplos no limitativos de funciones de células efectoras incluyen citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, fagocitosis dependiente de anticuerpos, fagocitosis, opsonización, opsonofagocitosis, unión celular, formación de rosetas, unión de C1q y citotoxicidad mediada por células dependiente del complemento.

En un caso preferido, la alteración en la afinidad o función efectora es por lo menos 2 veces, preferiblemente por lo menos 4 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 6 veces, por lo menos 7 veces, por lo menos 8 veces, por lo menos 9 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 50 veces, o por lo menos 100 veces, con respecto a la de una molécula comparable que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otros casos de la divulgación, la región Fc variante se une inmuno-específicamente a uno o más FcR con por lo menos un 65%, preferiblemente por lo menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225% o 250% más de afinidad con respecto a una molécula que comprende una Región Fc de tipo salvaje. Tales mediciones pueden ser ensayos *in vivo* o *in vitro* y, en un caso preferido, son ensayos *in vitro* como ELISA o ensayos de resonancia de plasmones de superficie.

En diferentes casos, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc variante en donde dicha variante agoniza por lo menos una actividad de un receptor FcγR, o antagoniza por lo menos una actividad de un receptor FcγR. En un caso preferido, las moléculas comprenden una variante que antagoniza con una o más actividades de FcγRIIB, por ejemplo, señalización mediada por receptor de células B, activación de células B, proliferación de células B, producción de anticuerpos, influjo de calcio intracelular de células B, progresión del ciclo celular, inhibición de la señalización de FcεRI mediada por FcγRIIB, fosforilación de FcγRIIB, reclutamiento de SHIP, fosforilación de SHIP y asociación con Shc, o actividad de una o más moléculas en sentido descendente (por ejemplo, MAP quinasa, JNK, p38 o Akt) en la vía de transducción de señales de FcγRIIB. En otro caso, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una variante que agoniza con una o más actividades de FcεRI, por ejemplo, activación de mastocitos, movilización de calcio, desgranulación, producción

de citoquinas o liberación de serotonina.

En ciertos casos, las moléculas comprenden una región Fc que comprende regiones de dos o más isotipos de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Como se usa en la presente, se dice que una región Fc es de un isotipo de IgG particular si su secuencia de aminoácidos es más homóloga a ese isotipo con respecto a otros isotipos de IgG. Los varios isotipos de IgG muestran diferentes propiedades físicas y funcionales, incluyendo la vida media en suero, la fijación del complemento, las afinidades de unión de FcγR y las actividades de la función efectora (por ejemplo, ADCC, CDC, etc.) debido a diferencias en las secuencias de aminoácidos de su región bisagra y/o Fc, por ejemplo, como se describe en Flesch y Neppert (1999) J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel et al. (1993) J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040; o Brüggemann et al. (1987) J. Exp. Med 166:1351-1361. Este tipo de región Fc variante puede usarse sola, o en combinación con una modificación de aminoácidos, para afectar a la función efectora mediada por Fc y/o la actividad de unión. En combinación, la modificación de aminoácidos y la región Fc/bisagra de IgG pueden mostrar una funcionalidad similar (por ejemplo, afinidad aumentada por FcγRIIA) y puede actuar aditivamente o, más preferiblemente, sinérgicamente para modificar la funcionalidad efectora en la molécula de la divulgación, con respecto a una molécula de la divulgación que comprende una región Fc de tipo salvaje. En otros casos, la modificación de aminoácidos y la región Fc de IgG pueden mostrar una funcionalidad opuesta (por ejemplo, afinidad aumentada y disminuida por FcγRIIA, respectivamente) y pueden actuar para templar o reducir selectivamente una funcionalidad específica en la molécula de la divulgación, con respecto a una molécula de la divulgación que no comprende una región Fc o que comprende una región Fc de tipo salvaje del mismo isotipo.

En un caso específico preferido, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácidos con respecto a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicha molécula tiene una afinidad alterada por un FcR, siempre que dicha región Fc variante no tenga una sustitución en las posiciones que hacen un contacto directo con FcγR basado en análisis cristalográfico y estructural de interacciones Fc-FcR como las divulgadas por Sondermann et al. (2000) Nature 406: 267-73. Ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que hacen contacto directo con FcγR son los residuos de aminoácidos 234-239, los residuos de aminoácidos 265-269 (giro B/C), los residuos de aminoácidos 297-299 (giro C'/E) y residuos de aminoácidos 327-332 (giro F/G). En algunos casos, las moléculas de la divulgación comprenden variantes de regiones Fc que comprenden la modificación de por lo menos un residuo que no hace contacto directo con un FcγR en base a análisis estructural y cristalográfico, por ejemplo, no está dentro del sitio de unión Fc-FcγR.

Las regiones Fc variantes son bien conocidas en la técnica, y en la presente divulgación puede usarse cualquier región Fc variante conocida para conferir o modificar la función efectora mostrada por una molécula de la divulgación que comprende una región Fc (o porción de la misma) como se ensaya funcionalmente, por ejemplo, en un ensayo dependiente de NK o dependiente de macrófagos. Por ejemplo, las variantes de la región Fc identificadas como alteración de la función efectora se divulgan en las Publicaciones de PCT N° WO 04/063351; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; y WO 2008/140603, y puede usarse cualquier variante adecuada divulgada en la mismas en las presentes moléculas.

En ciertos casos, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc variante, que tiene una o más modificaciones de aminoácidos en una o más regiones, tales modificaciones alteran (con respecto a una región Fc de tipo salvaje) la **Proporción de afinidades** de la región Fc variante con un FcγR activador (como FcγRIIA o FcγRIIAA) con respecto a un FcγR inhibidor (como FcγRIIB):

$$\text{Proporción de Afinidades} = \frac{\text{Cambio de tipo salvaje a variante en afinidad para Fc}\gamma\text{R}_{\text{Activadora}}}{\text{Cambio de tipo salvaje a variante en afinidad para Fc}\gamma\text{R}_{\text{Inhibidora}}}$$

Se prefieren particularmente las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación que poseen una región Fc variante (con respecto a la región Fc de tipo salvaje) en la que la región Fc variante tiene una proporción de afinidades mayor de 1. Tales moléculas tienen un uso particular en proporcionar un tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, trastorno o infección, o la mejora de un síntoma del mismo, donde se desea una eficacia mejorada de la función de la célula efectora (por ejemplo, ADCC) mediada por FcγR, por ejemplo, cáncer o enfermedad infecciosa. Por el contrario, una región Fc variante que tiene una proporción de afinidades de menos de 1 media la disminución de la eficacia de la función de la célula efectora. La **Tabla 1** enumera mutaciones ejemplares simples, dobles, triples, cuádruples y quintuples según si su Proporción de Afinidades es mayor o menor que 1.

Tabla 1 Mutaciones simples y múltiples ejemplares enumeradas por proporción de afinidades				
Simple	Doble	Triple	Cuádruple	Quíntuple
Proporción de afinidades > 1				
F243L	F243L y R292P	F243L, P247L y N421K	L234F, F243L, R292P y Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L
D270E	F243L y Y300L	F243L, R292P y Y300L	L235I, F243L, R292P y Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L y P396L
R292G	F243L y P396L	F243L, R292P y V305I	L235Q, F243L, R292P y Y300L	F243L, R292P, V305I, Y300L y P396L
R292P	D270E y P396L	F243L, R292P y P396L	F243L, P247L, D270E y N421K	
	R292P y Y300L	F243L, Y300L y P396L	F243L, R255L, D270E y P396L	
	R292P y V305I	P247L, D270E y N421K	F243L, D270E, G316D y R416G	
	R292P y P396L	R255L, D270E y P396L	F243L, D270E, K392T y P396L	
	Y300L y P396L	D270E, G316D y R416G	F243L, D270E, P396L y Q419H	
	P396L y Q419H	D270E, K392T y P396L	F243L, R292P, Y300L y P396L	
		D270E, P396L y Q419H	F243L, R292P, V305I y P396L	
		V284M, R292L y K370N	P247L, D270E, Y300L y N421K	
		R292P, Y300L y P396L	R255L, D270E, R292G y P396L	
			R255L, D270E, Y300L y P396L	
			D270E, G316D, P396L y R416G	
Proporción de afinidades < 1				
Y300L	F243L y P396L	F243L, R292P y V305I		
P396L	P247L y N421K			
	R255L y P396L			
	R292P y V305I			
	K392T y P396L			
	P396L y Q419H			

En un caso específico, en las regiones Fc variantes, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328 o 330 y preferiblemente uno o más de los siguientes residuos: A240, 1240, L241, L243, H244, N298, 1328 o V330. En un caso específico diferente, en las regiones Fc variantes, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 y preferiblemente uno o más de los siguientes residuos: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 o L300.

En un caso preferido, en las regiones Fc variantes que se unen a un FcγR con una afinidad alterada, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Preferiblemente, la variante Región Fc tiene cualquiera de los siguientes residuos: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 o A430.

En un caso diferente, en las regiones Fc variantes que se unen a un FcγR (a través de su región Fc) con

una afinidad reducida, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 o 439.

En un caso diferente, en las regiones Fc variantes que se unen a un FcγR (a través de su región Fc) con una afinidad mejorada, cualquier modificación de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones) en cualquiera de las posiciones 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 o 430. En un caso diferente, en las regiones Fc variantes que une FcγRIIA con una afinidad mejorada, cualquiera de los siguientes residuos: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 o A430.

Las variantes preferidas incluyen una o más modificaciones en cualquiera de las posiciones: 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 o 332.

Las variantes particularmente preferidas incluyen una o más modificaciones seleccionadas de los grupos A-AI:

A	228E, 228K, 228Y o 228G;
B	230A, 230E, 230Y o 230G;
C	231E, 231K, 231Y, 231P o 231G;
D	232E, 232K, 232Y, 232G;
E	233D;
F	234I o 234F;
G	235D, 235Q, 235P, 235I o 235V;
H	239D, 239E, 239N o 239Q;
I	240A, 240I, 240M o 240T;
J	243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H o 243I;
K	244H;
L	245A;
M	247G, 247V o 247L;
N	262A, 262E, 262I, 262T, 262E o 262F;
O	263A, 263I, 263M o 263T;
P	264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T o 264W;
Q	265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265V, 265N o 265Q;
R	266A, 266I, 266M o 266T;
S	271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W o 271G;
T	273I;
U	275L o 275W;
V	281D, 281K, 281Y o 281P;
W	284E, 284N, 284T, 284L, 284Y o 284M;
X	291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I o 291G;
Y	299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299V, 299W o 299Y;
Z	302I;
AA	304D, 304N, 304T, 304H o 304L
AB	305I;
AC	313F;
AD	323I;
AE	325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W o 325P;
AF	328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328A, 328E, 328F, 328H, 328M o 328N;
AG	330L, 330Y, 330I o 330V;
AH	332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G o 332Y; y
AI	336E, 336K o 336Y

ES 2 898 958 T3

Las variantes todavía más particularmente preferidas incluyen una o más modificaciones seleccionadas de los Grupos 1-105:

5	Grupo	Variante	Grupo	Variante
	1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
	2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
	3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
10	4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
	5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
	6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
	7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
15	8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
	9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
	10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
	11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
20	12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241 S / F243H / V262T / V264T
	13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
	14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
	15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
25	16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
	17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
	18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
30	19	P243L / V264I	72	S239E / D265N
	20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
	21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
	22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
35	23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
	24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
	25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
	26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
40	27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
	28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E
	29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
	30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
45	31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
	32	N297D / S298A / A330Y / I332E	85	S239N / I332E
	33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
	34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
50	35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E
	Grupo	Variante	Grupo	Variante
	36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D
	37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
55	38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
	39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
	40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
	41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
60	42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
	43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
	44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
	45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
65	46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E

(continuación)

Grupo	Variante	Grupo	Variante
5	47 S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
	48 S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332 E
	49 S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
	50 S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
	51 S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
10	52 S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
	53 S239D / D265I / N297D / I332E		

En un caso, una molécula de unión a PD-1 de la divulgación comprenderá una Región Fc variante que tiene por lo menos una modificación en la Región Fc. En ciertos casos, la región Fc variante comprende por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

En un caso específico, la región Fc variante comprende:

(A) por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L;

(B) por lo menos dos sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:

- (1) F243L y P396L;
- (2) F243L y R292P; y
- (3) R292P y V305I;

(C) por lo menos tres sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:

- (1) F243L, R292P e Y300L;
- (2) F243L, R292P y V305I;
- (3) F243L, R292P y P396L; y
- (4) R292P, V305I y P396L;

(D) por lo menos cuatro sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:

- (1) F243L, R292P, Y300L y P396L; y
- (2) F243L, R292P, V305I y P396L; o

(E) por lo menos las cinco sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de:

- (1) F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L; y
- (2) L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L.

En otro caso específico, la región Fc variante comprende sustituciones de:

- (A) F243L, R292P e Y300L;
- (B) L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L; o
- (C) F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

En un caso, una molécula de unión a PD-1 de la divulgación comprende una región Fc variante que muestra unión disminuida (o sustancialmente nula) a FcyRIA (CD64), FcyRIIA (CD32A), FcyRIIB (CD32B), FcyRIIIA (CD16a) o FcyRIIIB. (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de IgG1 de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 1**)). En un caso, una molécula de unión a PD-1 de la divulgación comprenderá una región Fc variante que muestra unión reducida (o sustancialmente nula) para un FcyR (por ejemplo, FcyRIIIA) y función efectora de ADCC reducida (o sustancialmente nula). En ciertos casos, la región Fc variante comprende por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de L234A, L235A, D265A, N297Q y N297G. En un caso específico, la región Fc variante comprende la sustitución de L234A; L235A; L234A y L235A; D265A; N297Q o N297G.

Una secuencia de IgG1 preferida para los dominios CH2 y CH3 de las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación tendrá las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO: 5**):

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

En un caso diferente, una molécula de unión a PD-1 de la divulgación comprende una región Fc que muestra inherentemente una unión disminuida (o sustancialmente nula) a FcγRIIIA (CD16a) y/o una función efectora reducida (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de tipo salvaje de IgG1 (**SEQ ID NO: 1**)). En un caso específico, una molécula de unión a PD-1 de la presente divulgación comprende una región Fc de IgG2 (**SEQ ID NO: 2**) o una región Fc de IgG4 (**SEQ ID NO: 4**). Cuando se utiliza una región Fc de IgG4, la presente divulgación también abarca la introducción de una mutación estabilizadora, como la sustitución S228P de la región bisagra de IgG4 (ver, por ejemplo, la **SEQ ID NO: 13**: ESKYGPPCPP P, (Lu et al., (2008)) "The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation", J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969) para reducir la incidencia de intercambio de cadenas. Pueden introducirse en una región Fc de IgG4 otras mutaciones estabilizadoras conocidas en la técnica (Peters, P et al., (2012) "Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability", J. Biol. Chem., 287:24525-24533; Publicación de patente de PCT N°: WO 2008/145142).

En otros casos, la divulgación abarca el uso de cualquier región Fc variante conocida en la técnica, como las divulgadas en Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγRIIIA: Current Models, Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function," Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For FcγRI, FcγRII, FcγRIII, And FcγRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The FcγRIIIA," J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) "Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc," J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. et al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking FcγRIIIA Receptor Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of Fc(γ)RIIIA And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. et al. (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human FcγRIIIA Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For FcγRIIIA Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By FcγRIIIA Receptors," FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo," Transplantation 57:1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse FcγRIIIA," Mol. Immunol. 29:53-59; Lund et al. (1991) "Human FcγRIIIA And FcγRIIIA Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG," J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG," Nature 332:563-564; Patentes de Estados Unidos N° 5.624.821; 5.885.573; 6.194.551; 7.276.586; y 7.317.091; y Publicaciones de PCT WO 00/42072 y PCT WO 99/58572.

En algunos casos, las moléculas de la divulgación comprenden además uno o más sitios de glicosilación, de tal manera que una o más fracciones de carbohidratos se unen covalentemente a la molécula. Preferiblemente, las moléculas de la divulgación con uno o más sitios de glicosilación y/o una o más modificaciones en la Región Fc confieren o tienen una función efectora mediada por anticuerpos mejorada, por ejemplo, actividad de ADCC mejorada, en comparación con el anticuerpo no modificado. En algunos casos, la divulgación comprende además moléculas que comprenden una o más modificaciones de aminoácidos que se sabe directa o indirectamente que interactúan con una fracción de carbohidrato de la región Fc incluyendo, pero no limitado a, los aminoácidos en las posiciones 241, 243, 244, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 y 301. Los aminoácidos que interactúan directa o indirectamente con una fracción de carbohidrato de una región Fc son conocidos en la técnica, ver, por ejemplo, Jefferis et al., 1995 Immunology Letters, 44: 111-7.

En otro caso, la divulgación abarca moléculas que se han modificado introduciendo uno o más sitios de glicosilación en uno o más sitios de las moléculas, preferiblemente sin alterar la funcionalidad de las moléculas, por

ejemplo, actividad de unión al antígeno objetivo o FcγR. Pueden introducirse sitios de glicosilación en la región variable y/o constante de las moléculas de la divulgación. Como se usa en la presente, los "sitios de glicosilación" incluyen cualquier secuencia de aminoácidos específica en un anticuerpo al que se unirá específica y covalentemente un oligosacárido (es decir, los carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples enlazados entre sí). Las cadenas laterales de oligosacáridos están típicamente unidas a la estructura principal de un anticuerpo mediante enlaces N u O. La glicosilación N-enlazada se refiere a la unión de una fracción de oligosacárido a la cadena lateral de una fracción de asparagina. La glicosilación O-enlazada se refiere a la unión de una fracción de oligosacárido a un hidroxiaminoácido, por ejemplo, serina, treonina. Las moléculas de la divulgación pueden comprender uno o más sitios de glicosilación, incluyendo los sitios de glicosilación N-enlazados y O-enlazados. Puede usarse cualquier sitio de glicosilación para la glicosilación N-enlazada u O-enlazada conocido en la técnica de acuerdo con la presente divulgación. Un ejemplo de sitio de glicosilación N-enlazado que es útil de acuerdo con los métodos de la presente divulgación es la secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser, en donde X puede ser cualquier aminoácido y Thr/Ser indica una treonina o una serina. Tal sitio o sitios pueden introducirse en una molécula de la divulgación usando métodos bien conocidos en la técnica a los que pertenece esta divulgación (ver, por ejemplo, IN VITRO MUTAGENESIS, RECOMBINANT DNA: A SHORT COURSE, J. D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, New York, 1983, capítulo 8, págs. 106-116.) Un método ejemplar para introducir un sitio de glicosilación en una molécula de la divulgación puede comprender: modificar o mutar una secuencia de aminoácidos de la molécula de tal manera que se obtenga la secuencia Asn-X-Thr/Ser deseada.

En algunos casos, la divulgación abarca métodos para modificar el contenido de carbohidratos de una molécula de la divulgación mediante la adición o eliminación de un sitio de glicosilación. Los métodos para modificar el contenido de carbohidratos de los anticuerpos (y moléculas que comprenden dominios de anticuerpos, por ejemplo, Región Fc) son bien conocidos en la técnica y se incluyen en la divulgación, ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 6.218.149; EP 0 359096 B1; Publicación de Estados Unidos Nº US 2002/0028486; WO 03/035835; Publicación de Estados Unidos Nº 2003/0115614; Patente de Estados Unidos Nº 6.218.149; Patente de Estados Unidos Nº 6.472.511. En otros casos, la divulgación abarca métodos para modificar el contenido de carbohidratos de una molécula de la divulgación eliminando una o más fracciones de carbohidratos endógenos de la molécula. En un caso específico, la divulgación abarca el desplazamiento del sitio de glicosilación de la región Fc de un anticuerpo, modificando posiciones adyacentes a 297. En un caso específico, la divulgación abarca la modificación de la posición 296 de tal manera que la posición 296 y no la posición 297 esté glicosilada.

La función efectora también puede modificarse mediante técnicas como la introducción de uno o más residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo que se produzca la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región, lo que da como resultado la generación de un anticuerpo homodimérico que puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o muerte celular mediada por el complemento aumentada y ADCC (Caron, P.C. et al. (1992) "Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies", J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) "A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity," J. Immunol. 148(9):2918-2922. También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada usando reticuladores heterobifuncionales como se describe en Wolff, E.A. et al. (1993) "Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice," Cancer Research 53:2560-2565. Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo que tenga regiones Fc duales y puede por lo tanto tener capacidades mejoradas de lisis del complemento y de ADCC (Stevenson, G.T. et al. (1989) "A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge", Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

La vida media en suero de las moléculas de la presente divulgación que comprenden regiones Fc puede aumentarse aumentando la afinidad de unión de la región Fc por FcRn. El término "vida media" como se usa en la presente significa una propiedad farmacocinética de una molécula que es una medida del tiempo medio de supervivencia de las moléculas después de su administración. La vida media puede expresarse como el tiempo necesario para eliminar el cincuenta por ciento (50%) de una cantidad conocida de la molécula del cuerpo de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano u otro mamífero) o un compartimento específico del mismo, por ejemplo, según se mide en suero, es decir, vida media circulante, o en otros tejidos. En general, un aumento de la vida media da como resultado un aumento del tiempo medio de residencia (MRT) en circulación para la molécula administrada.

En algunos casos, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende por lo menos una modificación de aminoácido con respecto a una región Fc de tipo salvaje, de tal manera que dicha molécula tiene una vida media aumentada (con respecto a una región Fc de tipo salvaje).

En algunos casos, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación comprenden una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una sustitución de aminoácidos que extiende la vida media en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435 y 436. En la técnica se conocen numerosas mutaciones específicas capaces de aumentar la vida media de una molécula que contiene la región Fc e incluyen, por ejemplo, M252Y, S254T, T256E y combinaciones de las mismas.

Por ejemplo, ver las mutaciones descritas en las Patentes de Estados Unidos N° 6.277.375, 7.083.784; 7.217.797, 8.088.376; Publicaciones de Estados Unidos N° 2002/0147311; 2007/0148164; y Publicaciones internacionales N° WO 98/23289; WO 2009/058492; y WO 2010/033279. Las moléculas que contienen la región Fc con una vida media mejorada también incluyen aquellas con sustituciones en dos o más de los residuos de la región Fc 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 y 436. En particular, dos o más sustituciones seleccionadas de: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K e Y436I.

En un caso específico, la región Fc variante comprende sustituciones de:

- (A) M252Y, S254T y T256E;
- (B) M252Y y S254T;
- (C) M252Y y T256E;
- (D) T250Q y M428L;
- (E) T307Q y N434A;
- (F) A378V y N434A;
- (G) N434A y Y436I;
- (H) V308P y N434A; o
- (I) K288D y H435K.

La presente divulgación abarca además regiones Fc variantes que comprenden:

- (A) una o más mutaciones que alteran la función efectora y/o FcγR; y
- (B) una o más mutaciones que prolongan la vida media en suero.

VI. Moléculas de unión a PD-1 antihumanas biespecíficas

Un caso de la presente divulgación se refiere a moléculas de unión biespecíficas que son capaces de unirse a un **"primer epítipo"** y un **"segundo epítipo"**, en donde el primer epítipo es un epítipo de PD-1 humana y el segundo epítipo es el mismo o diferente epítipo de PD-1, o es un epítipo de otra molécula que está presente en la superficie de una célula inmunitaria (como un linfocito T) y participa en la regulación de un punto de control inmunológico. En un caso, el segundo epítipo es un epítipo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD3, CD8, CD16, CD27, CD32, CD40, CD40L, CD47, CD64, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectina-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 o VISTA. En un caso, el segundo epítipo no es un epítipo de PD-1. En un caso específico, el segundo epítipo es CD137, CTLA-4, LAG-3, OX40, TIGIT o TIM-3. En ciertos casos, una molécula biespecífica comprende más de dos sitios de unión a epítipos. Tales moléculas biespecíficas pueden unirse a dos o más epítipos diferentes de LAG-3 y por lo menos a un epítipo de una molécula que no es LAG-3.

La presente divulgación abarca anticuerpos biespecíficos capaces de unirse simultáneamente a PD-1 y al segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). En algunos casos, el anticuerpo biespecífico capaz de unirse simultáneamente a PD-1 y el segundo epítipo se produce usando cualquiera de los métodos descritos en las Publicaciones de PCT N° WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116, WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873, y WO 2014/022540.

A. Diacuerpos biespecíficos que carecen de regiones Fc

Un caso de la presente divulgación se refiere a diacuerpos biespecíficos que comprenden, y más preferiblemente están compuestos por, una primera cadena polipeptídica y una segunda cadena polipeptídica, cuyas secuencias permiten que las cadenas polipeptídicas se unan covalentemente entre sí para formar un diacuerpo asociado covalentemente que es capaz de unirse simultáneamente a un primer epítipo y a un segundo epítipo, tales epítipos no siendo idénticos entre sí. Tales diacuerpos biespecíficos comprenden por tanto dominios **"VL1"/"VH1"** que son capaces de unirse al primer epítipo y dominios **"VL2"/"VH2"** que son capaces de unirse al segundo epítipo. La notación **"VL1"** y **"VH1"** indican, respectivamente, el dominio de cadena ligera variable y el dominio de cadena pesada variable que se unen al "primer" epítipo de dicho diacuerpo biespecífico. De manera similar, la notación **"VL2"** y **"VH2"** indica, respectivamente, el dominio de cadena ligera variable y el dominio de cadena pesada variable que se unen al "segundo" epítipo de dicho diacuerpo biespecífico. Es irrelevante si un epítipo particular se designa como el primer o el segundo epítipo; teniendo dicha notación relevancia sólo con respecto a la presencia y orientación de los dominios de las cadenas polipeptídicas de las moléculas de unión de la presente divulgación. En un caso, uno de tales epítipos es un epítipo de PD-1 y el otro de tales epítipos no es un epítipo de PD-1 (por ejemplo, un epítipo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR,

LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR TIM-3, etc.).

El dominio VL de la primera cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH de la segunda cadena polipeptídica para formar un primer sitio de unión al antígeno funcional que es específico para un primer antígeno (es decir, o PD-1 o un antígeno que contiene el segundo epítipo). De igual manera, el dominio VL de la segunda cadena polipeptídica interactúa con el dominio VH de la primera cadena polipeptídica para formar un segundo sitio funcional de unión al antígeno que es específico para un segundo antígeno (es decir, o un antígeno que contiene el segundo epítipo o PD-1). Por tanto, la selección de los dominios VL y VH de la primera y segunda cadenas polipeptídicas está coordinada, de tal manera que las dos cadenas polipeptídicas del diacuerpo comprenden colectivamente los dominios VL y VH capaces de unirse tanto a un epítipo de PD-1 como al segundo epítipo (es decir, comprenden VL_{PD-1}/VH_{PD-1} y VL2/VH2, en donde PD-1 es el "primer" epítipo, o VL1/VH1 y VL_{PD-1}/VH_{PD-1}, en donde PD-1 es el "segundo" epítipo).

La primera cadena polipeptídica de un caso de tales diacuerpos biespecíficos comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N-terminal, el Dominio VL1 de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al primer o segundo epítipo (es decir, ya sea VL_{PD-1} o VL_{Epítipo 2}), un primer péptido espaciador intermedio (Conector 1), un Dominio VH2 de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al segundo epítipo (si dicha primera cadena polipeptídica contiene VL_{PD-1}) o al primero epítipo (si dicha primera cadena polipeptídica contiene el VL_{Epítipo 2}), un segundo péptido espaciador intermedio (Conector 2) que contiene opcionalmente un residuo de cisteína, un dominio promotor de heterodímero y un extremo C-terminal (**Figura 1**).

La segunda cadena polipeptídica de este caso de diacuerpos biespecíficos comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal, un extremo N-terminal, un Dominio VL2 de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 o al segundo epítipo (es decir, VL_{PD-1} o VL_{Epítipo 2}, y el dominio VL no siendo seleccionado para su inclusión en la primera cadena polipeptídica del diacuerpo), un péptido conector intermedio (Conector 1), un dominio VH1 de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse o al segundo epítipo (si dicha segunda cadena polipeptídica contiene VL_{PD-1}) o PD-1 (si dicha segunda cadena polipeptídica contiene VL_{Epítipo 2}), un segundo péptido espaciador intermedio (Conector 2) que contiene opcionalmente un residuo de cisteína, un dominio promotor de heterodímero y un extremo C-terminal (**Figura 1**).

Más preferiblemente, la longitud del péptido conector intermedio (por ejemplo, Conector 1) que separa dichos dominios VL y VH se selecciona para evitar sustancial o completamente que los dominios VL y VH de la cadena polipeptídica se unan entre sí. Por tanto, los dominios VL y VH de la primera cadena polipeptídica son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. De igual manera, los dominios VL y VH de la segunda cadena polipeptídica son sustancial o completamente incapaces de unirse entre sí. Un péptido espaciador intermedio preferido (Conector 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 14**): GGGSGGGG.

La longitud y composición del segundo péptido conector intermedio (Conector 2) se selecciona basándose en la elección de dominios promotores de heterodímeros. Típicamente, el segundo péptido conector intermedio (Conector 2) comprenderá de 3 a 20 residuos de aminoácidos. En particular, cuando los dominios promotores de heterodímeros no comprenden un residuo de cisteína, se utiliza un segundo péptido conector intermedio que contiene cisteína (Conector 2). Un segundo péptido espaciador intermedio que contiene cisteína (Conector 2) contendrá 1, 2, 3 o más cisteínas. Un péptido espaciador que contiene cisteína preferido (Conector 2) tiene la secuencia **SEQ ID NO: 15**: GGCGGG. Alternativamente, el Conector 2 no comprende una cisteína (por ejemplo, GGG, GGGS (**SEQ ID NO: 29**), LGGGSG (**SEQ ID NO: 261**), GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO: 262**), ASTKG (**SEQ ID NO: 30**), LEPKSS (**SEQ ID NO: 33**), APSSS (**SEQ ID NO: 34**), etc.) y un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína, como se describe a continuación. Opcionalmente, se usan tanto un Conector 2 que contiene cisteína como un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína.

Los dominios promotores de heterodímeros pueden ser GVEPKSC (**SEQ ID NO: 16**) o VEPKSC (**SEQ ID NO: 17**) o AEPKSC (**SEQ ID NO: 18**) en una cadena polipeptídica y GFNRGEC (**SEQ ID NO: 19**) o FNRGEC (**SEQ ID NO: 18**) (**SEQ ID NO: 20**) en la otra cadena polipeptídica (US2007/0004909).

Más preferiblemente, sin embargo, los dominios promotores de heterodímeros de tales diacuerpos se forman a partir de uno, dos, tres o cuatro dominios helicoidales repetidos en tándem de carga opuesta que comprenden una secuencia de por lo menos seis, por lo menos siete o por lo menos ocho residuos de aminoácidos de tal manera que el dominio promotor de heterodímeros posee una carga neta (Apostolovic, B. et al. (2008) "pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil," Biomacromolecules 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) "Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain," J. Molec. Biol. 312:221-228; Arndt, K.M. et al. (2002) "Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils," Structure 10:1235-1248; Boucher, C. et al. (2010) "Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil Interactions," Analytical Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. et al. (2004) "Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy," J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. et al. (2003) "Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo

Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding," Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. et al. (2012) "Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag," Protein Science 21:511-519; Ghosh, T.S. et al. (2009) "End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures," Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. et al. (2008) "Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions," Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Litowski, J.R. et al. (2002) "Designing Heterodimeric Two-Stranded α -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity," J. Biol. Chem. 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. et al. (2012) "The d'-d'-d' Vertical Triad is Less Discriminating Than the a'-a'-a' Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif," J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626-2633; Straussman, R. et al. (2007) "Kinking the Coiled Coil - Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface," J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Tripet, B. et al. (2002) "Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance," J. Molec. Biol. 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) "The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies," Adv. Prot. Chem. 70:79-112; Zeng, Y. et al. (2008) "A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism," J. Gene Med. 10:355-367).

Tales dominios helicoidales repetidos pueden ser repeticiones exactas o pueden tener sustituciones. Por ejemplo, el dominio helicoidal del dominio promotor de heterodímero de la primera cadena polipeptídica puede comprender una secuencia de ocho residuos de aminoácidos seleccionados para conferir una carga negativa a dicho dominio promotor de heterodímeros, y el dominio helicoidal del dominio promotor de heterodímeros de la segunda cadena polipeptídica puede comprender una secuencia de ocho residuos de aminoácidos seleccionados para conferir una carga positiva a dicho dominio promotor de heterodímeros. Es indiferente qué la espiral se proporcione a la primera o segunda cadenas polipeptídicas, siempre que se use una espiral de carga opuesta para la otra cadena polipeptídica. El aminoácido cargado positivamente puede ser lisina, arginina, histidina, etc. y/o el aminoácido cargado negativamente puede ser ácido glutámico, ácido aspártico, etc. El aminoácido cargado positivamente es preferiblemente lisina y/o el aminoácido cargado negativamente es preferiblemente ácido glutámico. Es posible que solo se emplee un único dominio promotor de heterodímeros (ya que dicho dominio inhibirá la homodimerización y, por lo tanto, promoverá la heterodimerización), sin embargo, se prefiere que tanto la primera como la segunda cadena polipeptídica de los diacuerpos de la presente divulgación contengan dominios promotores de la heterodimerización.

En un caso preferido, uno de los dominios promotores de heterodímeros comprenderá cuatro dominios helicoidales "espiral E" en tándem (SEQ ID NO: 21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK), cuyos residuos de glutamato formarán una carga negativa a pH 7, mientras que el otro de los dominios promotores de heterodímeros comprenderá cuatro dominios en tándem "espiral K" (SEQ ID NO: 22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE), cuyos residuos de lisina formarán una carga positiva a pH 7. La presencia de tales dominios cargados promueve la asociación entre el primer y el segundo polipéptidos y, por tanto, fomenta la formación de heterodímeros. Se prefiere especialmente un dominio promotor de heterodímeros en el que uno de los cuatro dominios helicoidales "espiral E" en tándem de la SEQ ID NO: 21 se ha modificado para contener un residuo de cisteína: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23). De igual manera, se prefiere especialmente un dominio promotor de heterodímeros en el que uno de los cuatro dominios helicoidales en tándem "espiral K" de la SEQ ID NO: 22 se ha modificado para contener un residuo de cisteína: KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO: 24).

Como se divulga en la WO 2012/018687, para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de los diacuerpos, puede modificarse un diacuerpo para que contenga una porción polipeptídica de una proteína de unión al suero en uno o más de los extremos terminales del diacuerpo. Lo más preferible, dicha porción de polipéptido de una proteína de unión a suero se instalará en el extremo C-terminal del diacuerpo. La albúmina es la proteína más abundante en plasma y tiene una vida media de 19 días en humanos. La albúmina posee varios sitios de unión a moléculas pequeñas que le permiten unirse no covalentemente a otras proteínas y, por lo tanto, extiende su vida media en suero. El dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa de *Streptococcus* G148 consta de 46 residuos de aminoácidos que forman un haz estable de tres hélices y tiene una amplia especificidad de unión a albúmina (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120. Por tanto, una porción polipeptídica particularmente preferida de una proteína de unión al suero para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de un diacuerpo es el dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína estreptocócica G, y más preferiblemente, el dominio de unión a albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus dysgalactiae* (SEQ ID NO: 25): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Como se divulga en la WO 2012/162068, las variantes "desinmunizadas" de la SEQ ID NO: 25 tienen la capacidad de atenuar o eliminar la unión del MHC de clase II. En base a los resultados de la mutación combinacional, se considera que las siguientes combinaciones de sustituciones son sustituciones preferidas para formar tal ABD desinmunizado: ABD: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Las variantes de ABD que tienen las modificaciones L64A, I65A y D79A o las modificaciones

N66S, T70S y D79A. Se prefieren particularmente los ABD desinmunizados variantes que tienen la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLID₆₆NAKS₇₀A₇₁EGVKALIDEILAALP (SEQ ID NO: 26),

o la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA₆₄A₆₅NNAKT VEGVKALIA₇₉EILAALP (SEQ ID NO: 27),

o la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS₆₆NAKS₇₀ VEGVKALIA₇₉EILAALP (SEQ ID NO: 28),

ya que tales ABD desinmunizados muestran una unión sustancialmente de tipo salvaje a la vez que proporcionan una unión atenuada a MHC de clase II. Por tanto, la primera cadena polipeptídica de tal diacuerpo que tiene un ABD contiene un conector peptídico colocado preferiblemente en el extremo C terminal del dominio de la espiral E (o espiral K) de dicha cadena polipeptídica para intervenir entre el Dominio espiral E (o espiral K) y el ABD (que es preferiblemente un ABD desinmunizado). Una secuencia preferida para tal péptido conector es SEQ ID NO: 29: GGGS.

B. Diacuerpos biespecíficos que contienen regiones Fc

Un caso de la presente divulgación se refiere a diacuerpos biespecíficos que comprenden una región Fc capaz de unirse simultáneamente a PD-1 y a un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). La adición de un dominio CH2-CH3 de IgG a una o ambas cadenas polipeptídicas de diacuerpo, de tal manera que la formación de complejos de las cadenas de diacuerpo da como resultado la formación de una región Fc, aumenta la vida media biológica y/o altera la valencia del diabody. La incorporación de dominios CH2-CH3 de IgG en ambos polipéptidos de diacuerpo permitirá que se forme un diacuerpo biespecífico de dos cadenas que contiene la región Fc (Figura 2).

Alternativamente, la incorporación de dominios CH2-CH3 de IgG en solo uno de los polipéptidos de diacuerpo permitirá que se forme un diacuerpo más complejo de cuatro cadenas biespecífico que contenga la región Fc (Figuras 3A-3C). La Figura 3C muestra un diacuerpo de cuatro cadenas representativo que posee el dominio ligero constante (CL) y el dominio CH1 pesado constante, sin embargo, pueden emplearse alternativamente fragmentos de tales dominios, así como otros polipéptidos (ver, por ejemplo, las Figuras 3A y 3B, Publicaciones de patente de Estados Unidos N° 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicaciones de Patente Europea N° EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones de PCT N° WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). Así, por ejemplo, en lugar del dominio CH1, puede emplearse un péptido que tenga la secuencia de aminoácidos GVEPKSC (SEQ ID NO: 16) VEPKSC (SEQ ID NO: 17), o AEPKSC (SEQ ID NO: 18), derivada del dominio bisagra de una IgG humana, y en lugar del dominio CL, pueden emplearse los 6 aminoácidos C-terminales de la cadena ligera kappa humana, GFNRGEC (SEQ ID NO: 19) o FNRGEC (SEQ ID NO: 20). En la se muestra Figura 3A un péptido representativo que contiene diacuerpo de cuatro cadenas. Alternativamente, o además, puede emplearse un péptido que comprende dominios helicoidales en tándem de carga opuesta, como los dominios helicoidales "espiral E" (SEQ ID NO: 21: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK o SEQ ID NO: 23: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK); y los dominios "espiral K" (SEQ ID NO: 22: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE o SEQ ID NO: 24: KVAACKKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE). En la Figura 3B se muestra un dominio espiral representativo que contiene diacuerpo de cuatro cadenas.

Las moléculas de diacuerpo que contienen la región Fc de la presente divulgación incluyen generalmente péptidos conectores intermedios adicionales (Conectores). Típicamente, los conectores adicionales comprenderán de 3 a 20 residuos de aminoácidos. Los conectores adicionales o alternativos que pueden emplearse en las moléculas de diacuerpo que contienen la región Fc de la presente divulgación incluyen: GGGS (SEQ ID NO: 29), LGGGSG (SEQ ID NO: 261), GGGSGGGSGGG (SEQ ID NO: 262), ASTKG (SEQ ID NO: 30), DKHTHTCPPCP (SEQ ID NO: 31), EPKSCDKHTHTCPPCP (SEQ ID NO: 32), LEPKSS (SEQ ID NO: 33), APSSS (SEQ ID NO: 34) y APSSSPME (SEQ ID NO: 35), LEPKSADKHTHTCPPCSEQ ID NO: 36), GGC y GGG. Puede usarse la SEQ ID NO: 33 en lugar de GGG o GGC para facilitar la clonación. Además, los aminoácidos GGG, o la SEQ ID NO: 33 pueden ir seguidos inmediatamente de la SEQ ID NO: 31 para formar los conectores alternativos: GGGDKHTHTCPPCP (SEQ ID NO: 263); y LEPKSSDKHTHTCPPCP (SEQ ID NO: 37). La molécula de diacuerpo que contiene la región Fc de la presente divulgación puede incorporar una región bisagra de IgG además de o en lugar de un conector. Las regiones bisagra ejemplares incluyen: EPKSCDKHTHTCPPCP (SEQ ID NO: 32) de IgG1, ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 11) de IgG2, ESKYGPCCPSCP (SEQ ID NO: 12) de IgG4 y ESKYGPCCPSCP (SEQ ID NO: 13) una variante de bisagra de IgG4 que comprende un sustituto estabilizador para reducir el intercambio de cadenas.

Como se proporciona en la Figura 3A-3C, los diacuerpos de la divulgación pueden comprender cuatro cadenas diferentes. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de dicho diacuerpo contienen tres dominios: (i) un dominio que contiene VL1, (ii) un dominio que contiene VH2, (iii) un dominio promotor de heterodímeros y (iv) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas contienen: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio promotor de heterodímeros, donde los dominios promotores de heterodímeros promueven la dimerización de la primer/tercera cadenas polipeptídicas con la segunda/cuarta cadenas polipeptídicas. Los dominios VL y/o VH de la tercera y la cuarta cadenas polipeptídicas, y los dominios VL y/o VH de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas pueden ser iguales o diferentes para

permitir una unión tetravalente que sea monoespecífica, biespecífica o tetraespecífica. La notación "VL3" y "VH3" denotan, respectivamente, el dominio de cadena ligera variable y el dominio de cadena pesada variable que se unen al "tercer" epítipo de dicho diacuerpo. De manera similar, la notación "VL4" y "VH4" denotan, respectivamente, el dominio de cadena ligera variable y el dominio de cadena pesada variable que se unen al "cuarto" epítipo de dicho diacuerpo. La estructura general de las cadenas polipeptídicas de un diacuerpo que contiene la Región Fc de cuatro cadenas representativa de la divulgación se proporciona en la **Tabla 2**:

Tabla 2		
Biespecífico	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Tetraespecífico	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH
	4ª Cadena	NH ₂ -VL4-VH3-HPD-COOH
HPD = dominio promotor de heterodímeros		

En un caso específico, los diacuerpos de la presente divulgación son biespecíficos, tetravalentes (es decir, poseen cuatro sitios de unión al epítipo), diacuerpos que contienen Fc (**Figuras 3A-3C**) que se componen de cuatro cadenas polipeptídicas totales. Los diacuerpos biespecíficos, tetravalentes, que contienen Fc de la divulgación comprenden dos sitios de unión al epítipo inmuno-específicos para PD-1 (que pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo de PD-1 o a diferentes epítipos de PD-1), y dos sitios de unión de epítipo específicos para un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

En un caso adicional, los diacuerpos que contienen la Región Fc biespecífica pueden comprender tres cadenas polipeptídicas. El primer polipéptido de dicho diacuerpo contiene tres dominios: (i) un dominio que contiene VL1, (ii) un dominio que contiene VH2 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. El segundo polipéptido de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la primera cadena polipeptídica del diacuerpo. El tercer polipéptido de tales diacuerpos comprende una secuencia CH2-CH3. Por tanto, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos se asocian entre sí para formar un sitio de unión VL1/VH1 que es capaz de unirse al primer epítipo, así como un sitio de unión VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítipo. El primer y el segundo polipéptidos están unidos entre sí a través de un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína en sus terceros dominios respectivos. En particular, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas forman complejos entre sí para formar una región Fc que se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Tales diacuerpos tienen una potencia mejorada. Las **Figuras 4A y 4B** ilustran las estructuras de tales diacuerpos. Tales diacuerpos biespecíficos que contienen la región Fc pueden tener dos orientaciones (**Tabla 3**):

Tabla 3		
Primera orientación	3ª Cadena	NH ₂ -CH2-CH3-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Segunda orientación	3ª Cadena	NH ₂ -CH2-CH3-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
HPD = dominio promotor de heterodímeros		

En un caso específico, los diacuerpos de la presente divulgación son diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, bivalentes (es decir, poseen dos sitios de unión al epítipo) (**Figuras 4A-4B**) que se componen de tres cadenas polipeptídicas totales. Los diacuerpos bivalentes que contienen Fc biespecíficos de la divulgación comprenden un sitio de unión al epítipo inmuno-específico para PD-1 y un sitio de unión al epítipo específico para un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

En un caso adicional, los diacuerpos que contienen la región Fc biespecífica pueden comprender un total de cinco cadenas polipeptídicas. En un caso particular, dos de dichas cinco cadenas polipeptídicas tienen la misma secuencia de aminoácidos. La primera cadena polipeptídica de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La primera cadena polipeptídica puede ser la cadena pesada de un anticuerpo que contiene una VH1 y una región constante de

cadena pesada. La segunda y la quinta cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos contienen: (i) un dominio que contiene VL1 y (ii) un dominio que contiene CL. La segunda y/o la quinta cadena polipeptídica de tales diacuerpos pueden ser cadenas ligeras de un anticuerpo que contiene una VL1 complementaria a la VH1 de la primera/tercera cadena polipeptídica. La primera, la segunda y/o la quinta cadena polipeptídica pueden aislarse a partir de anticuerpos de origen natural. Alternativamente, pueden construirse de recombinantemente. La tercera cadena polipeptídica de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CHI, (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3, (iv) un dominio que contiene VL2, (v) un dominio que contiene VH3 y (vi) un dominio promotor de heterodímeros, donde los dominios promotores de heterodímeros promueven la dimerización de la tercera cadena con la cuarta cadena. El cuarto polipéptido de tales diacuerpos contiene: (i) un dominio que contiene VL3, (ii) un dominio que contiene VH2 y (iii) un dominio que promueve la heterodimerización y la unión covalente con la tercera cadena polipeptídica del diacuerpo.

Por tanto, la primera y la segunda, y la tercera y la quinta, cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos se asocian entre sí para formar dos sitios de unión de VL1/VH1 capaces de unirse a un primer epítipo. La tercera y la cuarta cadenas polipeptídicas de tales diacuerpos se asocian entre sí para formar un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse a un segundo epítipo, así como un sitio de unión de VL3/VH3 que es capaz de unirse a un tercer epítipo. El primer y el tercer polipéptidos están unidos entre sí a través de un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína en sus respectivas regiones constantes. En particular, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas forman un complejo entre sí para formar una Región Fc. Tales diacuerpos tienen una potencia mejorada. La **Figura 5** ilustra la estructura de tales diacuerpos. Se entenderá que los dominios VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3 pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión monoespecífica, biespecífica o triespecífica. Sin embargo, como se proporciona en la presente, estos dominios se seleccionan preferiblemente para unir PD-1 y un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

Los dominios VL y VH de las cadenas polipeptídicas se seleccionan para formar sitios de unión VL/VH específicos para un epítipo deseado. Los sitios de unión VL/VH formados por la asociación de las cadenas polipeptídicas pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión tetravalente que sea monoespecífica, biespecífica, triespecífica o tetraespecífica. En particular, los dominios VL y VH pueden seleccionarse de tal manera que un diacuerpo biespecífico pueda comprender dos sitios de unión para un primer epítipo y dos sitios de unión para un segundo epítipo, o tres sitios de unión para un primer epítipo y un sitio de unión para un segundo epítipo, o dos sitios de unión para un primer epítipo, un sitio de unión para un segundo epítipo y un sitio de unión para un tercer epítipo (como se muestra en la **Figura 5**). La estructura general de las cadenas polipeptídicas de los diacuerpos que contienen la Región Fc de cinco cadenas representativas de la divulgación se proporciona en la **Tabla 4**:

Tabla 4		
Biespecífico (2x2)	2ª Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH
	5ª Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH2-HPD-COOH
Biespecífico (3x1)	2ª Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH
	5ª Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
Triespecífico (2x1x1)	2ª Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH
	5ª Cadena	NH ₂ -VL1-CL-COOH
	4ª Cadena	NH ₂ -VL3-VH2-HPD-COOH
HPD = dominio promotor de heterodímeros		

En un caso específico, los diacuerpos de la presente divulgación son diacuerpos que contienen Fc biespecíficos, tetravalentes (es decir, poseen cuatro sitios de unión al epítipo), que están compuestos por cinco cadenas polipeptídicas totales que tienen dos sitios de unión para un primer epítipo y dos sitios de unión para un segundo epítipo. En un caso, los diacuerpos biespecíficos, tetravalentes, que contienen Fc de la divulgación comprenden dos sitios de unión al epítipo inmunoespecíficos para PD-1 (que pueden ser capaces de unirse al

mismo epítipo de PD-1 o a diferentes epítipos de PD-1) y dos sitios de unión a epítipo específicos para un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). En otro caso, los diacuerpos biespecíficos, tetravalentes, que contienen Fc de la divulgación comprenden tres sitios de unión a epítipo inmuno-específicos para PD-1 que pueden ser capaces de unirse al mismo epítipo de PD-1 o a diferentes epítipos de PD-1), y un sitio de unión a epítipo específico para un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). En otro caso, los diacuerpos biespecíficos tetravalentes que contienen Fc de la divulgación comprenden un sitio de unión a epítipo inmuno-específico para PD-1, y tres sitios de unión a epítipo específicos para un segundo epítipo (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

C. Moléculas de unión trivalentes biespecíficas que contienen regiones Fc

Un caso adicional de la presente divulgación se refiere a moléculas de unión biespecíficas trivalentes, que comprenden una región Fc, y que son capaces de unirse simultáneamente a un primer epítipo, un segundo epítipo y un tercer epítipo, en donde por lo menos uno de tales epítipos no es idéntico a otro. Tales diacuerpos biespecíficos comprenden por tanto dominios "VL1"/"VH1" que son capaces de unirse al primer epítipo, dominios "VL2"/"VH2" que son capaces de unirse al segundo epítipo y dominios "VL3"/"VH3" que son capaces de unirse al tercer epítipo. En un caso, uno o dos de tales epítipos es un epítipo de PD-1 y otro (o el otro) de tales epítipos no es un epítipo de PD-1 (por ejemplo, un epítipo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-1, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Tales moléculas de unión trivalentes biespecíficas comprenden tres sitios de unión a epítipos, dos de los cuales son dominios de unión de tipo diacuerpo, que proporcionan el sitio de unión A y el sitio de unión B, y uno de los cuales es un dominio de unión de tipo no diacuerpo, que proporciona el sitio de unión C (ver, por ejemplo, las Figuras 6A-6F, y la Solicitud de PCT N°: PCT/US15/33081; y PCT/US15/33076).

Típicamente, las moléculas de unión trivalentes de la presente divulgación comprenderán cuatro cadenas polipeptídicas diferentes (ver las Figuras 6A-6B), sin embargo, las moléculas pueden comprender un número mayor o menor de cadenas polipeptídicas, por ejemplo fusionando tales cadenas polipeptídicas entre sí (por ejemplo, mediante un enlace peptídico) o dividiendo tales cadenas polipeptídicas para formar cadenas polipeptídicas adicionales, o asociando menos o cadenas polipeptídicas adicionales mediante enlaces disulfuro. Las Figuras 6B-6F ilustran este aspecto de la presente divulgación representando esquemáticamente tales moléculas que tienen tres cadenas polipeptídicas. Como se proporciona en las Figuras 6A-6F, las moléculas de unión trivalentes de la presente divulgación pueden tener orientaciones alternativas en las que los dominios de unión de tipo diacuerpo son N-terminales (Figuras 6A, 6C y 6D) o C-terminales (Figuras 6B, 6E y 6F) a una región FC.

En ciertos casos, la primera cadena polipeptídica de tales moléculas de unión trivalentes de la presente divulgación contiene: (i) un dominio que contiene VL1, (ii) un dominio que contiene VH2, (iii) un dominio promotor de heterodímeros, y (iv) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. Los dominios VL1 y VL2 están localizados N-terminales o C-terminales en el dominio que contiene CH2-CH3 como se presenta en la Tabla 5 (Figuras 6A y 6B). La segunda cadena polipeptídica de tales casos contiene: (i) un dominio que contiene VL2, (ii) un dominio que contiene VH1 y (iii) un dominio promotor de heterodímeros. La tercera cadena polipeptídica de tales casos contiene: (i) un dominio que contiene VH3, (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3. La tercera cadena polipeptídica puede ser la cadena pesada de un anticuerpo que contiene una VH3 y una región constante de cadena pesada. El cuarto polipéptido de tales casos contiene: (i) un dominio que contiene VL3 y (ii) un dominio que contiene CL. La cuarta cadena polipeptídica puede ser una cadena ligera de un anticuerpo que contiene una VL3 complementaria a la VH3 de la tercera cadena polipeptídica. La tercera o cuarta cadenas polipeptídicas pueden aislarse de anticuerpos de origen natural. Alternativamente, pueden construirse recombinantemente, sintéticamente o mediante otros medios.

El dominio de cadena ligera variable de la primera y la segunda cadenas polipeptídicas se separa de los dominios de cadena pesada variable de dichas cadenas polipeptídicas mediante un conector espaciador intermedio que tiene una longitud que es demasiado corta para permitir que sus dominios VL1/VH2 (o sus VL2/VH1) se asocien para formar un sitio de unión al epítipo capaz de unirse al primer o al segundo epítipo. Un péptido espaciador intermedio preferido (Conector 1) para este propósito tiene la secuencia (SEQ ID NO: 14): GGGSGGGG. Otros dominios de las moléculas de unión trivalentes pueden estar separados por uno o más péptidos espaciadores intermedios, que comprenden opcionalmente un residuo de cisteína. En la presente se proporcionan conectores ejemplares útiles para la generación de moléculas de unión trivalentes y también se proporcionan en las Solicitudes de PCT N°: PCT/US15/33081; y PCT/US15/33076. Por tanto, la primera y la segunda cadenas polipeptídicas de tales moléculas de unión trivalentes se asocian para formar un sitio de unión VL1/VH1 capaz de unirse a un primer epítipo, así como un sitio de unión VL2/VH2 que es capaz de unirse a un segundo epítipo. La tercera y la cuarta cadenas polipeptídicas de tales moléculas de unión trivalentes se asocian para formar un sitio de unión de VL3/VH3 que es capaz de unirse a un tercer epítipo. Se entenderá que los dominios VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3 pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión que sea monoespecífica, biespecífica o triespecífica.

Como se ha descrito anteriormente, las moléculas de unión trivalentes de la presente divulgación pueden comprender tres polipéptidos. Pueden obtenerse moléculas de unión trivalentes que comprenden tres cadenas polipeptídicas uniendo los dominios del cuarto polipéptido N-terminal al dominio que contiene VH3 del tercer polipéptido. Alternativamente, se utiliza una tercera cadena polipeptídica de una molécula de unión trivalente de la divulgación que contiene los siguientes tres dominios: (i) un dominio que contiene VL3, (ii) un dominio que contiene VH3 y (iii) un dominio que contiene una secuencia CH2-CH3, en donde la VL3 y la VH3 están separadas entre sí por un péptido espaciador intermedio que es lo suficientemente largo (por lo menos 9 o más residuos de aminoácidos) para permitir la asociación de estos dominios para formar un sitio de unión al epítipo.

Se entenderá que los dominios VL1/VH1, VL2/VH2 y VL3/VH3 pueden ser iguales o diferentes para permitir una unión mono-específica, bio-específica o tri-específica. Sin embargo, como se proporciona en la presente, estos dominios se seleccionan preferiblemente para unir PD-1 y un segundo epítipo (o un segundo y tercer epítipo) (preferiblemente, tales epítipos son epítipos de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3 MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.).

En particular, los dominios VL y VH pueden seleccionarse de tal manera que una molécula de unión trivalente comprenda dos sitios de unión para un primer epítipo y uno para un segundo epítipo, o un sitio de unión para un primer epítipo y dos sitios de unión para un segundo epítipo, o un sitio de unión para un primer epítipo, un sitio de unión para un segundo epítipo y un sitio de unión para un tercer epítipo. La estructura general de las cadenas polipeptídicas de moléculas de unión trivalentes representativas de la divulgación se proporciona en las Figuras 6A-6F y en la Tabla 5:

Tabla 5		
1ª Orientación de Cuatro Cadenas	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	4ª Cadena	NH ₂ -VL3-CL-COOH
2ª Orientación de Cuatro Cadenas	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPDCOOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH
	4ª Cadena	NH ₂ -VL3-CL-COOH
1ª Orientación de Tres Cadenas	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
2ª Orientación de Tres cadenas	2ª Cadena	NH ₂ -VL2-VH1-HPD-COOH
	1ª Cadena	NH ₂ -CH2-CH3-VL1-VH2-HPDCOOH
	3ª Cadena	NH ₂ -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH
HPD = dominio promotor de heterodímeros		

Un caso de la presente divulgación se refiere a moléculas de unión trivalentes bio-específicas que comprenden dos sitios de unión a epítipo para PD-1 y un sitio de unión a epítipo para el segundo epítipo presente en una molécula distinta de PD-1 (por ejemplo, B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Los dos sitios de unión a epítipo para PD-1 pueden unirse al mismo epítipo o a diferentes epítipos. Otro caso de la presente divulgación se refiere a moléculas de unión trivalentes bio-específicas que comprenden un sitio de unión a epítipo para PD-1 y dos sitios de unión a epítipo que se unen a un segundo antígeno presente en una molécula distinta de PD-1 (por ejemplo B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD80, CD86, CD137, CTLA-4, ICOS, KIR, LAG-3, MHC de clase I o II, OX40, PD-L1, TCR, TIM-3, etc.). Los dos sitios de unión a epítipo para el segundo antígeno pueden unirse al mismo epítipo o diferentes epítipos del antígeno (por ejemplo, el mismo o diferentes epítipos de LAG-3). Como se ha proporcionado anteriormente, tales moléculas de unión trivalentes bio-específicas pueden comprender tres o cuatro cadenas polipeptídicas.

VII. Dominios constantes y regiones Fc

En la presente se proporcionan dominios constantes de anticuerpos útiles en la generación de moléculas de unión a PD-1 (por ejemplo, anticuerpos, diacuerpos, moléculas de unión trivalentes, etc.) de la divulgación.

Un dominio CL preferido es un dominio CL de Kappa de IgG humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CL Kappa humano ejemplar es (SEQ ID NO: 8):

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
 SFNRGEC

Alternativamente, un dominio CL ejemplar es un dominio Lambda CL de IgG humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CL Kappa humano ejemplar es **(SEQ ID NO: 9)**:

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
 GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP
 TECS

Como se proporciona en la presente, las moléculas de unión a PD-1 de la invención pueden comprender una Región Fc. La región Fc de tales moléculas de la divulgación puede ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación pueden comprender además un dominio CH1 y/o una región bisagra. Cuando está presente, el dominio CH1 y/o la región bisagra pueden ser de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), y es preferiblemente del mismo isotipo que la región Fc deseada.

Un dominio CH1 ejemplar es un dominio CH1 de IgG1 humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CH1 de IgG1 humano ejemplar es **(SEQ ID NO: 10)**:

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

Un dominio CH1 ejemplar es un dominio CH1 de IgG2 humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CH1 de IgG2 humano ejemplar es **(SEQ ID NO: 257)**:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

Un dominio CH1 ejemplar es un dominio CH1 de IgG4 humano. La secuencia de aminoácidos de un dominio CH1 de IgG4 humano ejemplar es **(SEQ ID NO: 254)**:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

Una región bisagra ejemplar es una región bisagra de IgG1 humana. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG1 humana ejemplar es **(SEQ ID NO: 32)**: EPKSCDKTHTCPPCP.

Otra región bisagra ejemplar es una región bisagra de IgG2 humana. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG2 humana ejemplar es **(SEQ ID NO: 11)**: ERKCCVECPPCP.

Otra región bisagra ejemplar es una región bisagra de IgG4 humana. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG4 humana ejemplar es **(SEQ ID NO: 12)**: ESKYGPPCPSCP. Como se describe en la presente, una región bisagra de IgG4 puede comprender una mutación estabilizadora como la sustitución S228P. La secuencia de aminoácidos de una región bisagra de IgG4 estabilizada ejemplar es **(SEQ ID NO: 13)**: ESKYGPPCPPCP.

La región Fc de las moléculas que contienen la región Fc (por ejemplo, anticuerpos, diacuerpos y moléculas trivalentes) de la presente divulgación puede ser o una región Fc completa (por ejemplo, una región Fc de IgG completa) o solo un fragmento de una región Fc. Opcionalmente, la región Fc de las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación carece del residuo de aminoácido de lisina C-terminal. En particular, la región Fc de las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación puede ser una región Fc variante modificada. Aunque la región Fc de las moléculas que contienen la región Fc biespecífica de la presente divulgación puede poseer la capacidad de unirse a uno o más receptores Fc (por ejemplo., FcγR(s)), más preferiblemente dicha región Fc variante tiene unión alterada a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por una región Fc de tipo salvaje) o tendrán una capacidad sustancialmente reducida o nula para unirse al receptor o receptores inhibidores. Por tanto, la región Fc de las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación puede incluir parte o la totalidad del dominio CH2 y/o parte o la totalidad del dominio CH3 de una región Fc completa, o puede comprender una secuencia de CH2

variante y/o de CH3 variante (que puede incluir, por ejemplo, una o más inserciones y/o una o más deleciones con respecto a los dominios CH2 o CH3 de una región Fc completa). Tales regiones Fc pueden comprender porciones de polipéptidos que no son Fc, o pueden comprender porciones de regiones Fc no naturalmente completas, o pueden comprender orientaciones de origen no natural de dominios CH2 y/o CH3 (como, por ejemplo, dos dominios CH2 o dos dominios CH3, o en la dirección N-terminal a C-terminal, un dominio CH3 enlazado a un dominio CH2, etc.).

Las modificaciones de la región Fc identificadas como que altera la función efectora son conocidas en la técnica, incluyendo las modificaciones que aumentan la unión a los receptores activadores (por ejemplo, FcγRIIA (CD16A) y reducen la unión a los receptores inhibidores (por ejemplo, FcγRIIB (CD32B) (ver, por ejemplo, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγgamma Receptors", Cancer Res. 57(18):8882-8890). Las variantes ejemplares de regiones Fc de IgG1 humana con unión reducida a CD32B y/o unión aumentada a CD16A contienen sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I o P296L. Estas sustituciones de aminoácidos pueden estar presentes en una región Fc de IgG1 humana en cualquier combinación o subcombinación. En un caso, la variante de la región Fc de IgG1 humana contiene una sustitución F243L, R292P e Y300L. En otro caso, la variante de la región Fc de IgG1 humana contiene sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I y P296L.

En particular, se prefiere que las regiones Fc de las cadenas polipeptídicas de las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación muestren una unión disminuida (o sustancialmente nula) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de IgG1 de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 1**). Las regiones Fc variantes y las formas mutantes capaces de mediar dicha unión alterada se han descrito anteriormente. En un caso específico, las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación comprenden una región Fc de IgG que muestra una función efectora de ADCC reducida. En un caso preferido, el dominio CH2-CH3 de la primera y/o tercera cadenas polipeptídicas de tales moléculas que contienen la región Fc incluye 1, 2 o 3 cualquiera de las sustituciones: L234A, L235A, N297Q y N297G. En otro caso, la variante de la región Fc de IgG humana contiene una sustitución N297Q, una sustitución N297G, sustituciones L234A y L235A o una sustitución D265A, ya que estas mutaciones anulan la unión de FcR. Alternativamente, se utiliza un dominio CH2-CH3 de una región Fc que muestra inherentemente unión disminuida (o sustancialmente nula) a FcγRIIIA (CD16a) y/o función efectora reducida (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de IgG1 de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 1**)). En un caso específico, las moléculas que contienen la Región Fc de la presente divulgación comprenden una Región Fc de IgG2 (**SEQ ID NO: 2**) o una región Fc de IgG4 (**SEQ ID NO: 4**). Cuando se utiliza una región Fc de IgG4, la presente divulgación también abarca la introducción de una mutación estabilizadora, como la sustitución de la región bisagra S228P descrita anteriormente (ver, por ejemplo, **SEQ ID NO: 13**). Como las sustituciones N297G, N297Q, L234A, L235A y D265A suprimen la función efectora, en circunstancias en las que se desea la función efectora, preferiblemente no se emplearían estas sustituciones.

En particular, se prefiere que las regiones Fc de las cadenas polipeptídicas de las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación muestren una vida media en suero aumentada (con respecto a la vida media mostrada por la Fc de tipo salvaje correspondiente). Las regiones Fc variantes y las formas mutantes que muestran una vida media en suero prolongada se han descrito anteriormente. En un caso preferido, el dominio CH2-CH3 de la primera y/o la tercera cadenas polipeptídicas de tales moléculas que contienen la región Fc incluyen 1, 2 o 3 cualquiera de las sustituciones: M252Y, S254T y T256E. La divulgación abarca además moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación que comprenden regiones Fc variantes que comprenden:

- (A) una o más mutaciones que alteran la función efectora y/o FcγR; y
- (B) una o más mutaciones que prolongan la vida media en suero.

Una secuencia de IgG1 preferida para los dominios CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación comprenderá las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO: 258**):

```
APEAAGGPSV FLFPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPSPREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

Una secuencia de IgG4 preferida para los dominios CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la región Fc de la presente divulgación comprenderá las sustituciones M252Y/S254T/T256E (**SEQ ID NO: 259**):

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 5 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
 ALHNHYTQKS LSLSLGX

10 en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

Para diacuerpos y moléculas de unión trivalentes cuya primera y tercera cadenas polipeptídicas no son idénticas), es deseable reducir o evitar que se produzca la homodimerización entre los dominios CH2-CH3 de dos primeras cadenas polipeptídicas o entre los dominios CH2-CH3 de dos terceras cadenas polipeptídicas. No es necesario que los dominios CH2 y/o CH3 de tales cadenas polipeptídicas sean idénticas en secuencia, y ventajosamente se modifican para fomentar la formación de complejos entre las dos cadenas polipeptídicas. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos (preferiblemente una sustitución con un aminoácido que comprende un grupo lateral voluminoso que forma un "botón", por ejemplo, triptófano) puede introducirse en el dominio CH2 o CH3 de tal manera que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio mutado de manera similar y obligará al dominio mutado a aparearse con un dominio en el que se ha modificado una mutación complementaria o acomodaticia, es decir, "el agujero" (por ejemplo, una sustitución con glicina). Tales conjuntos de mutaciones pueden modificarse en cualquier pareja de polipéptidos que comprendan dominios CH2-CH3 que formen una región Fc. Los métodos de modificación de proteínas para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización son bien conocidos en la técnica, en particular con respecto a la modificación de moléculas similares a inmunoglobulinas, y se incluyen en la presente (ver, por ejemplo, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library," J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis," J. Immunol. Methods 296:95-101). Preferiblemente, el "botón" se modifica en los dominios CH2-CH3 de la primera cadena polipeptídica y el "agujero" se modifica en los dominios CH2-CH3 de la tercera cadena polipeptídica de diacuerpos que comprenden tres cadenas polipeptídicas. Por tanto, el "botón" ayudará a evitar que la primera cadena polipeptídica se homodimerice a través de sus dominios CH2 y/o CH3. Como la tercera cadena polipeptídica contiene preferiblemente la sustitución del "agujero", se heterodimerizará con la primera cadena polipeptídica y se homodimerizará consigo misma. Esta estrategia puede utilizarse para diacuerpos y moléculas de unión trivalentes que comprenden tres, cuatro o cinco cadenas como se ha detallado anteriormente, donde el "botón" se modifica en los dominios CH2-CH3 de la primera cadena polipeptídica y el "agujero" se modifica en los dominios CH2-CH3 de la tercera cadena polipeptídica.

Un botón preferido se crea modificando una región Fc de IgG para que contenga la modificación T366W. Un agujero preferido se crea modificando una región Fc de IgG para que contenga la modificación T366S, L368A e Y407V. Para ayudar a purificar el homodímero de la tercera cadena polipeptídica que lleva agujeros de la molécula que contiene la Región Fc heterodimérica biespecífica final, el sitio de unión de la proteína A de los dominios CH2 y CH3 que llevan agujeros de la tercera cadena polipeptídica se muta preferiblemente mediante sustitución de aminoácidos en la posición 435 (H435R). Por tanto, el homodímero de la tercera cadena polipeptídica que lleva agujeros no se unirá a la proteína A, mientras que el heterodímero biespecífico conservará su capacidad para unirse a la proteína A a través del sitio de unión de la proteína A en la primera cadena polipeptídica. En un caso alternativo, la tercera cadena polipeptídica que lleva agujeros puede incorporar sustituciones de aminoácidos en las posiciones 434 y 435 (N434A/N435K).

Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para los dominios CH2 y CH3 de la primera cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc de la presente divulgación tendrá la secuencia "**portadora de botones**" (SEQ ID NO: 6):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 55 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 60 ALHNHYTQKS LSLSPGX

en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para los dominios CH2 y CH3 de la segunda cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc de la presente divulgación que tiene dos cadenas

polipeptídicas (o la tercera cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc que tiene tres, cuatro, o cinco cadenas polipeptídicas) tendrán la secuencia "que lleva agujeros" (**SEQ ID NO: 7**):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 ALHNRYTQKS LSLSPGX

en donde, X es una lisina (K) o está ausente.

Como se observará, los dominios CH2-CH3 de la **SEQ ID NO: 6** y la **SEQ ID NO: 7** incluyen una sustitución en la posición 234 con alanina y 235 con alanina, y por tanto forman una región Fc que muestra unión disminuida (o sustancialmente nula) a FcγRII (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (con respecto a la unión mostrada por la región Fc de tipo salvaje (**SEQ ID NO: 1**)). La divulgación también abarca tales dominios CH2-CH3, que comprenden sustituciones alternativas y/o adicionales que modifican la función efectora y/o la actividad de unión a FcγR de la región Fc. La divulgación también abarca tales dominios CH2-CH3, que comprenden además una o más sustituciones de aminoácidos que prolongan la vida media. En particular, la divulgación abarca tales dominios CH2-CH3 con agujeros y con botones que además comprenden M252Y/S254T/T256E.

Se prefiere que la primera cadena polipeptídica tenga una secuencia CH2-CH3 "que lleve botones", tal como la de la **SEQ ID NO: 6**. Sin embargo, como se reconocerá, podría emplearse un dominio CH2-CH3 "que lleva botones" (por ejemplo, **SEQ ID NO: 7**) en la primera cadena polipeptídica, en cuyo caso, un dominio CH2-CH3 "que lleva botones". (por ejemplo, **SEQ ID NO: 6**) se emplearía en la segunda cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc de la presente divulgación que tiene dos cadenas polipeptídicas (o en la tercera cadena polipeptídica de una molécula que contiene la región Fc que tiene tres, cuatro o cinco cadenas polipeptídicas).

Como se ha detallado anteriormente, la divulgación abarca moléculas que contienen la región Fc (por ejemplo, anticuerpos y diacuerpos que contienen la región Fc) que tienen dominios CH2 y CH3 de tipo salvaje, o que tienen dominios CH2 y CH3 que comprenden combinaciones de las sustituciones descritas anteriormente. Una secuencia de aminoácidos ejemplar de un dominio CH2-CH3 de IgG1 que abarca tales variaciones es (**SEQ ID NO: 260**):

APEX₁X₂GGPSV FLFPPKPKDT LX₃IX₄RX₅PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLX₆CX₇VK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLX₈SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 ALHX₉X₁₀YTQKS LSLSPGX₁₁

en donde:

- (a) X₁ y X₂ son ambos L (tipo salvaje), o ambos son A (unión disminuida de FcγR);
- (b) X₃, X₄ y X₅ respectivamente son M, S y T (tipo salvaje), o son Y, T y E (vida media extendida);
- (c) X₆, X₇ y X₈ respectivamente son: T, L e Y (tipo salvaje), o son W, L e Y (botón), o S, A y V (agujero);
- (d) X₉ y X₁₀, respectivamente, son N y H (tipo salvaje), o son N y R (sin unión a proteína A), o A y K (sin unión a proteína A); y
- (e) X₁₁ es K o está ausente.

En otros casos, la divulgación abarca moléculas de unión a PD-1 que comprenden dominios CH2 y/o CH3 que se han modificado para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización usando mutaciones conocidas en la técnica, tales como las divulgadas en la Publicación de PCT N° WO 2007/110205; WO 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867.

VIII. Moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3

La presente divulgación se refiere particularmente a moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos biespecíficos, etc.) que comprenden un fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo anti-PD-1, y preferiblemente uno de los nuevos anticuerpos anti-PD-1 humana proporcionados en la presente, y un fragmento de unión a epítipo de un anticuerpo anti-LAG-3 humano, preferiblemente uno de los nuevos anticuerpos anti-LAG-3 humano proporcionados en la presente. Las moléculas de

unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 preferidas de la presente divulgación poseen fragmentos de anticuerpos de unión a epítipo que les permiten unirse coordinadamente a dos epítopos diferentes: un epítipo de PD-1 y un epítipo de LAG-3., para atenuar las actividades inhibitoras de tales moléculas. Como se usa en la presente, tal atenuación se refiere a una disminución de por lo menos el 20%, una disminución de por lo menos el 50%, una disminución de por lo menos el 80% o una disminución de por lo menos el 90% en la actividad inhibitora detectable PD-1 y/o LAG-3, o la eliminación completa de la actividad inhibitora detectable de PD-1 y/o LAG-3. La selección de los fragmentos de unión al epítipo (por ejemplo, dominios VL y VH) del anticuerpo anti-PD-1 humana y el anticuerpo anti-LAG-3 se coordina de tal manera que las cadenas polipeptídicas que componen tales moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 se ensamblan para formar por lo menos un sitio de unión al antígeno funcional que es específico para el primer antígeno (es decir, PD-1 o LAG-3) y por lo menos un sitio de unión al antígeno funcional que es específico para el segundo antígeno (es decir, PD-1 o LAG-3, dependiendo de la identidad del primer antígeno).

En un caso particular, una molécula de unión biespecífica de PD-1 x LAG-3 de la presente divulgación es un diacuerpo biespecífico, que preferiblemente comprende dos, tres, cuatro o cinco cadenas polipeptídicas como se describe en la presente. En otro caso particular, una molécula de unión biespecífica de PD-1 x LAG-3 de la presente divulgación es un anticuerpo biespecífico, que preferiblemente comprende dos, tres o cuatro cadenas polipeptídicas como se describe en la presente (ver también, por ejemplo, WO 2007/024715; WO2007/110205; WO 2009/080251; WO 2009/080254; WO 2009/089004; WO 2011/069104; WO 2011/117329; WO 2011/131746; WO 2011/133886; WO 2011/143545; WO 2012/023053; WO 2013/060867).

A. Anticuerpos de LAG-3 antihumanos

A continuación se proporcionan ejemplos de anticuerpos que son inmunoespecíficos para LAG-3 humano. Pueden prepararse anticuerpos adicionales deseados aislando hibridomas secretores de anticuerpos provocados usando LAG-3 o un fragmento peptídico del mismo, o seleccionando bibliotecas de anticuerpos recombinantes para la unión a LAG-3 o un fragmento peptídico del mismo. El LAG-3 humano (que incluye una secuencia señal de 28 residuos de aminoácidos (que se muestra subrayada) y la proteína madura de 497 residuos de aminoácidos) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 38**):

MWEAQFLGLL FLQPLWVAPV KPLQPGAEVP VVWAQEGAPA QLPCSTIPL
 QDLSLLRRAG VTWQHQPDSG PPAAAPGHPL APGPHPAAPS SWGPRPRRYT
 VLSVGPGLR SGRLPLQPRV QLDERGRQRG DFSLWLRPAR RADAGEYRAA
 VHLRDRALSC RLRLRLGQAS MTASPPGSLR ASDWVILNCS FSRPDRPASV
 HWFRNRGQGR VPVRESPPHH LAESFLFLPQ VSPMDSGPWG CILTYRDGFN
 VSIMYNLTVL GLEPPTPLTV YAGAGSRVGL PCRLPAGVGT RSFLTAKWTP
 PGGGPDLLVT GDNGDFTLRL EDVSQAQAGT YTCHIHLEQEQ QLNATVTLAI
 ITVTPKSFSGS PGS LGKLLCE VTPVSGQERF VWSSLDTPSQ RSFSGPWLEA
 QEAQLLSQPW QCQLYQGERL LGAAVYFTEL SSPGAQRSGR APGALPAGHL
 LLFLILGVLS LLLLVGTGAFG FHLWRRQWRP RRFSALEQGI HPPQAQSKIE
 ELEQEPEPEP EPEPEPEPEP EPEQL

1. LAG-3 mAb A

Se han descrito el anticuerpo anti-LAG-3 humano BMS-986016 (25F7; Medarex/BMS), designado en la presente como "**LAG-3 mAb A**", y variantes del mismo (ver, por ejemplo, la WO 2014/008218). La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del **LAG-3 mAb A** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 39**) (las CDR se muestran subrayadas):

QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF DYYWNWIRQP PGKGLEWIGE
INHNGNNTSN PSLKSRVTLT LDTSKNQFSL KLRSVTAADT AVYYCAFGYS
DYEYNWFDPW GQGTLVTVSS

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del **LAG-3 mAb A** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 40**) (las CDR se muestran subrayadas):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
 GTNLEIK

Recientemente se han identificado anticuerpos anti-LAG-3 humanos murinos adicionales que poseen características de unión únicas (ver, la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 62/172.277). Las moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 preferidas de la presente divulgación comprenden los fragmentos de unión a epítipo del anticuerpo anti-LAG-3 humano **LAG-3 mAb 1** o **LAG-3 mAb 6**, anticuerpos, que se unen a un nuevo epítipo y no compita con BMS-986016 por la unión de LAG-3. Se prefieren particularmente, las moléculas de unión biespecíficas de PD-1 x LAG-3 de la presente divulgación que poseen dominios VH y/o VL humanizados de LAG-3 mAb 1 o LAG-3 mAb 6.

2. LAG-1 mAb 1

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 41) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados).

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFR NYGMNWVKQA PGKVLKWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFAF SLGTSASTAY LQINILKNE D TATYFCARES
LYDYYSMDYW GQGTSVTVSS

CDR _H 1 de LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 42):	RNYGMN
CDR _H 2 de LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 43):	WINTYTGESTYADDFEG
CDR _H 3 de LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 44):	ESLYDYYSM DY

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 45) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DVVVTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSQSLL HSDGKTYLNW LLQRPQGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFTGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLG V YYCWQGTHFP
YTFGGGKLE IK

CDR _L 1 de LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 46):	KSSQSLLHSDGKTYLN
CDR _L 2 de LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 47):	LVSELD S
CDR _L 3 de LAG-3 mAb 1 (SEQ ID NO: 48):	WQGT HFPYT

A continuación se proporcionan dos dominios VH humanizados ejemplares de LAG-3 mAb 1 designados en la presente como "hLAG-3 mAb 1 VH1" y "hLAG-3 mAb 1 VH2" y cuatro dominios VL humanizados ejemplares de LAG-3 mAb 1 "hLAG-3 mAb 1 VL1," "hLAG-3 mAb 1 VL2," "hLAG-3 mAb 1 VL3," y "hLAG-3 mAb 1 VL4". Cualquiera de los dominios VL humanizados puede emparejarse con cualquiera de los dominios VH humanizados para generar un dominio de unión a LAG-3. Por consiguiente, a cualquier anticuerpo que comprenda uno de los dominios VL humanizados emparejados con el dominio VH humanizado se hace referencia genéricamente como "hLAG-3 mAb 1" y a las combinaciones particulares de dominios VH/VL humanizados se hace referencia como los dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hLAG-3 mAb 1 VH1 y hLAG-3 mAb 1 VL2 se hace referencia específicamente como "hLAG-3 mAb 1 (1.2)".

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hLAG-3 mAb 1 VH1 (SEQ ID NO: 49) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hLAG-3 mAb 1 VH2 (SEQ ID NO: 50) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYFCARES
LYDYYSMDYW GQGTTVTVSS

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 1 VL1 (SEQ ID NO: 51)** (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGKVE IK

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 1 VL2 (SEQ ID NO: 52)** (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQSPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGKVE IK

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 1 VL3 (SEQ ID NO: 53)** (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDGKTYLNW LLQKPGQPPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGKVE IK

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de **hLAG-3 mAb 1 VL4 (SEQ ID NO: 54)** (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGKVE IK

La CDR_{L1} del dominio VL de hLAG-3 mAb 1 VL4 comprende una sustitución de aminoácidos de glicina por alanina y tiene la secuencia de aminoácidos: **KSSQSLLHSD A KTYLN (SEQ ID NO: 55)**, la alanina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios CDR_{L1} de LAG-3 mAb 1 descritos anteriormente.

3. LAG-3 mAb 6

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 56**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

EVLLQQSGPE LVKPGASVKI PCKASGYTFT DYNMDWVKQS HGESLEWIGD
INPDNGVTIY NQKFEGKATL TVDKSSSTAY MELRSLTSED TAVYYCAREA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

CDR_{H1} de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 57**):

CDR_{H2} de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 58**):

CDR_{H3} de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 59**):

DYNMD

DINPDNGVTIYNQKFEG

EADYFYFDY

A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de LAG-3 mAb 6 (**SEQ ID NO: 60**) (los residuos de CDR se muestran subrayados):

DIVMTQSHRF MSTSVGDRVS ITCKASQDVS SVVAWYQQKP GQSPKLLIFS
ASYRYTGVDPD RFTGSGSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYSTPWTFGG
 5 GTKLEIK

CDRL1 de LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 61): KASQDVSSWA
 CDR_{L2} de LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 62): SASYRYT
 CDR_{L3} de LAG-3 mAb 6 (SEQ ID NO: 63): HYSTPWT

10 A continuación se proporcionan dos dominios VH humanizados ejemplares de LAG-3 mAb 6 designados en la presente como "hLAG-3 mAb 6 VH1" y "hLAG-3 mAb 6 VH2" y dos dominios VL humanizados ejemplares de LAG-3 mAb 6 "hLAG-3 mAb 1 VL1" y "hLAG-3 mAb 1 VL2". Cualquiera de los dominios VL humanizados puede emparejarse con cualquiera de los dominios VH humanizados para generar un dominio de unión a LAG-3. Por consiguiente, a cualquier anticuerpo que comprenda uno de los dominios VL humanizados emparejados con el
 15 dominio VH humanizado se hace referencia genéricamente como "hLAG-3 mAb 6", y a las combinaciones particulares de dominios VH/VL humanizados se hace referencia como los dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hLAG-3 mAb 6 VH1 y hLAG-3 mAb 6 VL2 se hace referencia específicamente como "hLAG-3 mAb 6 (1.2)".

20 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VH de hLAG-3 mAb 6 VH1 (SEQ ID NO: 294) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

25 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYNMDWVRQA PGQGLEWMGD
INPDNGVTIY NQKFEGRVTM TTDSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

30 A continuación se muestra una secuencia de aminoácidos del dominio VH de hLAG-3 mAb 6 VH2 (SEQ ID NO: 295) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

35 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DYNMDWVRQA PGKGLEWVSD
INPDNGVTIY NQKFEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREEA
DYFYFDYWGQ GTTLTVSS

40 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hLAG-3 mAb 6 VL1 (SEQ ID NO: 296) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

45 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVPS RFTGSGSGTD FTFTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

50 A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos del dominio VL de hLAG-3 mAb 6 VL2 (SEQ ID NO: 297) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

55 DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASYRYTGVDPD RFTGSGSGTD FTFTISSLQP EDIAVYYCQQ HYSTPWTFGG
 GTKLEIK

60 La CDR_{L1} del dominio VL de hLAG-3 mAb 6 VL1 y VL2 comprende una sustitución de aminoácidos de lisina por arginina y tiene la secuencia de aminoácidos: RASQDVSSWA (SEQ ID NO: 298), la arginina sustituida se muestra subrayada). Se contempla que pueda incorporarse una sustitución similar en cualquiera de los dominios CDR_{L1} de LAG-3 mAb 6 descritos anteriormente.

B. Diacuerpos que contienen la región Fc de cuatro cadenas ejemplares y que tienen espirales E/K

65 Se generaron cuatro diacuerpos que contienen Región Fc de cuatro cadenas biespecíficos PD-1 X LAG-3 ejemplares que comprenden dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K (designados "DART A", "DART B", "DART C" y "DART I"). La estructura de estos diacuerpos que contienen la región Fc se detalla a continuación.

Se pretende que estos diacuerpos PD-1 x LAG-3 ejemplares ilustren, pero de ninguna manera limiten, el alcance de la divulgación.

1. DART A

DART A es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, una región Fc de IgG4 variante modificada para una vida media ampliada y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K que contienen cisteína. La primera y tercera cadenas polipeptídicas de DART A comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 23**)); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); un dominio CH2-CH3 de IgG4 variante que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART A es una variante de la **SEQ ID NO: 267**:

```

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDX1KTYLNW LLQKPGQPPE
RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
YTFGGGTKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAC
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKESKYGPP CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP
KPKDTLX2IX3R X4PEVTCVVVD VSQEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE
PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTPP
PVLDS DGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSL
G

```

en donde X₁, X₂, X₃ y X₄ se seleccionan independientemente, y donde X₁ es A o G; X₂ es Y o M; X₃ es T o S; y X₄ es E o T.

Las secuencias de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART A es la **SEQ ID NO: 267**, en donde X₁ es A; X₂ es Y; X₃ es T; y X₄ es E.

La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART A comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral K) (KVAACEK-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 24**)) y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART A es (**SEQ ID NO: 268**):

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVSVKVS CKASGYTFTN
YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL
QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTIVSSG GCGGKVAAC
KEKVAALKEK VAALEKEVAA LKE

```

2. DART B

DART B es idéntico a DART A, excepto que la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART B comprenden el dominio VL de hLAG-3 mAb 1 VL3 (SEQ ID NO: 53), que comprende una sustitución de aminoácidos en CDR_L1. Por tanto, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART B comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (V_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL3) (SEQ ID NO: 53); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (V_{hPD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO: 147); un péptido conector intermedio (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23)); una región bisagra de IgG4 estabilizada (SEQ ID NO: 13); una variante del dominio CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (SEQ ID NO: 259); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas polipeptídicas de DART B es la **SEQ ID NO: 267**, en donde X₁ es G; X₂ es Y; X₃ es T; y X₄ es E.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART B es la **SEQ ID NO: 268**.

3. DART C

DART C es idéntico a DART B, excepto que la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART C comprenden un dominio CH2-CH3 de IgG4 de tipo salvaje que carece del residuo C-terminal (SEQ ID NO: 4). Por tanto, la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART C comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (V_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL3) (SEQ ID NO: 53); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (V_{hPD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO: 147); un péptido conector intermedio (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23)); una región bisagra de IgG4 estabilizada (SEQ ID NO: 13); un dominio CH2-CH3 de IgG4 que carece del residuo C-terminal (SEQ ID NO: 4); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART C es la **SEQ ID NO: 267**, en donde X₁ es G; X₂ es M; X₃ es S; y X₄ es T.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART C es la **SEQ ID NO: 268**.

4. DART I

DART I es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, una región Fc de IgG4 variante diseñada para una vida media extendida y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K que contienen cisteína. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART I comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (V_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VL1) (SEQ ID NO: 296); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (V_{hPD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (SEQ ID NO: 147); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO: 23)); una región bisagra de IgG4 estabilizada (SEQ ID NO: 13); un dominio CH2-CH3 de IgG4 variante que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (SEQ ID NO: 259); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART I es (**SEQ ID NO: 290**):

5 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
 ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFFG
 10 GTKLEIKGGG SGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSKKAS GYSFTSYWMN
 WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
 LRSEDNAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTILV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA
 ALEKEVAALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
 15 LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL
 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLG

La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART I comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VH1) (**SEQ ID NO: 294**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros que contiene cisteína (espiral K) (KVAACE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 24**) y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART I es (**SEQ ID NO: 291**):

30 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTD
 35 YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRTMT TDTSTSTAYM
 ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TLTIVSSGGC GGGKVAACE
 KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

C. Diacuerpos que contienen la región Fc de cuatro cadenas ejemplares que tienen dominios CL/CH1

Se generaron cuatro diacuerpos que contienen región Fc de cuatro cadenas biespecíficos de PD-1 X LAG-3 que comprenden dominios CL/CH1 designados "**DART D**", "**DART E**", "**DART J**" y "**DART 1**". La estructura de estos diacuerpos que contienen la región Fc se detalla a continuación. Se pretende que estos diacuerpos PD-1 x LAG-3 ejemplares ilustren, pero de ninguna manera limiten, el alcance de la divulgación.

1. DART D

DART D es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1 y una región Fc de IgG4 variante modificada para una vida media prolongada. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART D comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); una variante de un dominio CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART D es (**SEQ ID NO: 269**):

60 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 65 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTN

YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL
 QISSLKAEEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL GGGSGASTKG
 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
 CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART D comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART D es (**SEQ ID NO: 270**):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
 YTFGGGKVE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGRTVAA
 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES
 VTEQDSKDST YSLSSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNRG
 EC

2. DART E

DART E es otro diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1 y una región Fc de IgG4 variante diseñada para una vida media prolongada. La posición de los sitios de unión de PD-1 y LAG-3 de DART E se invierte en comparación con DART D.

La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART E comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal, un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); una variante de un dominio CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas polipeptídicas de DART E es (**SEQ ID NO: 271**):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
 YTFGGGKVE IKGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSL GGGSGASTKG
 PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKVD KRVESKYGPP
 CPPCPAPEFL GGPSVFLFPP KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSQEDPEVQF
 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
 KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS
 DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC
 SVMHEALHNH YTQKSLSLSL G

La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART E comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VLPD-1 hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VHLAG-3 hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**) y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y cuarta cadenas polipeptídicas de DART E es (**SEQ ID NO: 272**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVVKVS CKASGYTFTN
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSL GGGSGRTVAA
 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSGNSQES
 VTEQDSKDST YSLSTLTLS KADYEKHKVY ACEVTHQGLS SPVTKSFNNG
 EC

3. DART J

DART J es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1 y una región Fc de IgG4 variante diseñada para una vida media prolongada. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART J comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VLLAG-3 hLAG-3 mAb 6 VL1) (**SEQ ID NO: 296**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VHPD-1 hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**); una región bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 13**); una variante de un dominio CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 259**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART J es (**SEQ ID NO: 292**):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
 ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFTGG
 5 GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN
 WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
 LRSEDNAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGTLV TVSSLGGGSG ASTKGPSVFP
 10 LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD
 15 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE
 20 ALHNHYTQKS LSLSLG

La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART J comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 6 VH1) (**SEQ ID NO: 294**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART J es (**SEQ ID NO: 293**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 35 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD
 YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVMTT TDTSTSTAYM
 ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWQGG TTLTVSSLGG GSGRTVAAPS
 40 VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNFPYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT
 EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

4. DART 1

DART 1 es un diacuerpo que contiene la región Fc de cuatro cadenas biespecífico que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1 y una región Fc de IgG1 variante diseñada para reducir la unión de FcγR. La primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART 1 comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} PD-1 mAb A VL) (**SEQ ID NO: 65**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} LAG-3 mAb A VH1) (**SEQ ID NO: 39**); un péptido conector intermedio (**Conector 2: LGGGSG (SEQ ID NO: 261)**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); una variante de un dominio CH2-CH3 de IgG1 que comprende las sustituciones L234A/L235A y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 5**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera y la tercera cadenas polipeptídicas de DART 1 es (**SEQ ID NO: 284**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSSIS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPLTFGQ
 GTNLEIKGGG SGGGGQVQLV ESGGGVVPQG RSLRLDCKAS GITFSNSGMH
 WVRQAPGKGL EWVAVIWDYG SKRYYADSVK GRFTISRDNK KNTLFLQMNS
 LRAEDTAVYY CATNDDYWGQ GTLVTVSSLG GSGGASTKGP SVFPLAPSSK
 STSGGTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV LQSSGLYSLS
 SVVTVPSSSL GTQTYICNVN HKPSNTKVDK RVEPKSCDKT HTCPCPCAPE
 AAGGPSVFLF PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE
 VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE
 KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES
 NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH
 NHYTQKSLSL SPG

La segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART 1 comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL_{LAG-3} LAG-3 mAb A VL) (**SEQ ID NO: 40**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} PD-1 mAb A VH) (**SEQ ID NO: 64**); un péptido conector intermedio (**Conector 2**: LGGSGG (**SEQ ID NO: 261**)); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la cuarta cadenas polipeptídicas de DART 1 es (**SEQ ID NO: 285**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIKGGG SGGGGQVQLQ QWGAGLLKPS ETLSTLCVAV GGSFSDYYWN
 WIRQPPGKGL EWIGEINHNG NTNSNPSTLKS RVTLSLDTSK NQFSLKLRSV
 TAADTAVYYC AFGYSDYEYN WFDPWGQGT VTVSSLGGGS GRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLV STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC

D. Diacuerpos que contienen la región Fc de cinco cadenas ejemplares

Se generaron dos diacuerpos que contienen la región Fc de cinco cadenas biespecífico PD-1 X LAG-3 ejemplares, que comprenden dominios CL/CH1 y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K designados **"DART F"** y **"DART G"**. La estructura de estos diacuerpos que contienen la región Fc se detalla a continuación. Se pretende que estos diacuerpos PD-1 x LAG-3 ejemplares ilustren, pero de ninguna manera limiten, el alcance de la divulgación.

1. DART F

DART F es un diacuerpo que contiene la región de cinco cadenas Fc biespecífico y que tiene tres sitios de unión específicos para PD-1, un sitio de unión específico para LAG-3, los dominios CL/CH1, una región Fc de IgG1 que lleva botón/agujero variante modificada para la unión de FcγR reducida y la vida media prolongada, y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K. La primera cadena polipeptídica de DART F comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 con agujeros que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K y que carece del residuo C-terminal

(**SEQ ID NO: 260**, donde X₁ es A, X₂ es A; X₃ es Y, X₄ es T, X₅ es E, X₆ es S, X₇ es A, X₈ es V, X₉ es A, X₁₀ es K y X₁₁ está ausente); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de DART F es (**SEQ ID NO: 273**):

5 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
 IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
 YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY
 10 ICNVNHNKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
 DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
 YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
 15 DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHAKYTQ KSLSLSPG

La segunda y la quinta cadenas polipeptídicas de DART F comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**), un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**), y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la quinta cadena polipeptídica de DART F es (**SEQ ID NO: 274**):

25 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
 30 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV
 THQGLSSPVT KSFNRGEC

La tercera cadena polipeptídica de DART F comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 que lleva un botón que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 260**, en donde X₁ es A, X₂ es A; X₃ es Y, X₄ es T, X₅ es E, X₆ es W, X₇ es L, X₈ es Y, X₉ es N, X₁₀ es H y X₁₁ está ausente); un péptido conector intermedio (GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO: 262**)); un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína

(**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 21**)); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica de DART F es (**SEQ ID NO: 275**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
 IHPSDSETWL DQKFKDRVIT TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
 YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY
 ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
 DTLYITREPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
 YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGGG
 GSGGSGGGGD IVMTQTPLSL SVTPGQPASI SCKSSQSLH SDAKTYLNWL
 LQKPGQPPER LIYLVSELDG GVPDRFSGSG SGTDFTLKIS RVEAEDVGVY
 YCWQGTHFPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVSVKVS
 CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPDSDSETWLD QKFKDRVITIT
 VDKSTSTAYM ELSSLRSED AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG
 CGGGEVAAL KEVAALKEV AALEKEVAAL EK

La cuarta cadena polipeptídica de DART F comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímero (espiral K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 22**)); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de las cuartas cadenas polipeptídicas de DART F es (**SEQ ID NO: 276**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVSVKVS CKASGYTFTN
 YGMNWVRQAP GQGLEWMGI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGKVAAL
 KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

2. DART G

DART G es un diacuerpo que contiene la región Fc de cinco cadenas biespecífico y que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, dominios CL/CH1, una variante de la región Fc de IgG1 con botón/agujero modificada para la unión de FcγR reducida y vida media prolongada, y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K. La primera cadena polipeptídica de DART G comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 con agujeros que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E/N434A/H435K y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 260**, donde X₁ es A, X₂ es A, X₃ es Y, X₄ es T, X₅ es E, X₆ es S, X₇ es A, X₈ es V, X₉ es A, X₁₀ es K y X₁₁ está ausente); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de DART G es (**SEQ ID NO: 277**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
 INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
 5 LYDYYSM DYW GQGT TVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
 10 KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV
 15 LDSDGSFFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHAKYT QKSLSLSPG

La segunda y la quinta cadenas polipeptídicas de DART G comprenden, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**), un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**), y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda y la quinta cadena polipeptídica de DART G es (**SEQ ID NO: 278**):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
 25 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHFP
 YTFGGGKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 30 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

La tercera cadena polipeptídica de DART G comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 que lleva un botón que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E y que carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO: 260**, donde X₁ es A, X₂ es A; X₃ es Y, X₄ es T, X₅ es E, X₆ es W, X₇ es L, X₈ es Y, X₉ es N, X₁₀ es H y X₁₁ está ausente); un péptido conector intermedio (GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO: 262**)); un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 21**)); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica de DART G es (**SEQ ID NO: 279**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
 INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
 LYDYYSDMDYW GQGTITVTSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
 KDTLYITREP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV
 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGG
 GSGSGSGGGG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF
 QQKPGQPPKL LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY
 FCQQSKEVPY TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVVKVS
 CKASGYSFTS YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT
 VDKSTSTAYM ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG
 CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

La cuarta cadena polipeptídica de DART G comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros (espiral K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 22**) y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de las cuartas cadenas polipeptídicas de DART G es (**SEQ ID NO: 280**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPASVVKVS CKASGYSFTS
 YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM
 ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGKVAALK
 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

E. Diacuerpo que contiene la región Fc de tres cadenas ejemplar y que tiene espirales E/K

La presente divulgación proporciona adicionalmente diacuerpos que contienen la Región Fc de tres cadenas biespecíficos de PD-1 X LAG-3, que comprenden dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K. Se generó un diacuerpo que contiene Región Fc de tres cadenas, biespecífico de PD-1 X LAG-3 ejemplar, que comprende dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K designado "**DART H**". La estructura de estos diacuerpos que contienen la región Fc se detalla a continuación. Se pretende que este diacuerpo PD-1 x LAG-3 ejemplar ilustre, pero de ninguna manera limite, el alcance de la divulgación.

DART H es un diacuerpo que contiene la región Fc de tres cadenas biespecífico que tiene un sitio de unión específico para PD-1, un sitio de unión específico para LAG-3, una región Fc de IgG1 variante con botón/agujero modificada para reducir la unión de FcγR, y dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K.

La primera cadena polipeptídica de DART H comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un péptido conector intermedio (**Conector 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO: 14)**); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2: GGCGGG (SEQ ID NO: 15)**); un dominio promotor de heterodímeros (espiral E) (EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO: 21**)); un conector intermedio (**Espaciador-Conector 3: GGGDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 263)**); un dominio CH2-CH3 de IgG1 que lleva un botón que comprende las sustituciones L234A/L235A y que tiene el residuo de lisina C-terminal (**SEQ ID NO: 6**); y

un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de DART H es (**SEQ ID NO: 281**):

5 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTN
 10 YGMNWVRQAP GQGLEWMGWI NTYTGESTYA DDFEGRFVFS MDTASASTAYL
 QISSLKAEDT AVYYCARESL YDYYSMDYWG QGTTVTVSSG GCGGGEVAAL
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP
 15 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 20 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
 PGK

25 La segunda cadena polipeptídica de DART H comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un péptido conector intermedio (**Conector 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO: 14**)); un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un péptido conector intermedio que contiene cisteína (**Conector 2**: GGCGGG (**SEQ ID NO: 15**)); un dominio promotor de heterodímeros (espiral K) (KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO: 22**)); y un extremo C-terminal.

30 La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica de DART H es (**SEQ ID NO: 282**):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLH HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
 35 YTFGGGKVE IKGGS GGGGQ VQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGKVAAL
 40 KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

45 La tercera cadena polipeptídica de DART H comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; una región bisagra (DKHTCPCP (**SEQ ID NO: 31**)); un dominio CH2-CH3 de IgG1 que lleva un agujero que comprende las sustituciones L234A/L235A y que tiene el residuo de lisina C-terminal (**SEQ ID NO: 7**); y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica de DART H es (**SEQ ID NO: 283**):

50 DKHTCPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK
 GFYPDI AVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG
 55 NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

F. Anticuerpo biespecífico ejemplar

60 Se generó un anticuerpo biespecífico de cuatro cadenas de PD-1 X LAG-3 ejemplar designado "**BSAB A**". La estructura de este anticuerpo biespecífico se detalla a continuación. Se pretende que este anticuerpo biespecífico de PD-1 x LAG-3 ejemplar ilustre, pero de ninguna manera limite, el alcance de la divulgación.

65 BSAB A es un anticuerpo biespecífico que tiene un sitio de unión específico para PD-1, un sitio de unión específico para LAG-3, una región Fc de IgG1 variante diseñada para reducir la unión de FcγR y fomentar la

formación de complejos entre los dos polipéptidos de cadena pesada diferentes (ver, por ejemplo, la WO 2011/143545).

La primera cadena polipeptídica de BSAB A comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VH_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VH1) (**SEQ ID NO: 147**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 variante que comprende las sustituciones D221E/P228E (numeradas por el índice EU según Kabat y subrayadas en las **SEQ ID NO: 286**, a continuación); un dominio CH2-CH3 de IgG1 variante que comprende las sustituciones L234A/L235A/L368E (subrayadas en la **SEQ ID NO: 286**, a continuación) y que carece del residuo C-terminal; y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la primera cadena polipeptídica de BSAB A es (**SEQ ID NO: 286**):

```

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHNKPSN TKVDKRVEPK SCEKTHTCPE CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTCE VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

```

La segunda cadena polipeptídica de BSAB comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a PD-1 (VL_{PD-1} hPD-1 mAb 7 VL2) (**SEQ ID NO: 153**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**) y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena polipeptídica de BSAB es (**SEQ ID NO: 287**):

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

La tercera cadena polipeptídica de BSAB A comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VH_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VH1) (**SEQ ID NO: 49**); un dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**); una región bisagra de IgG1 variante que comprende las sustituciones D221R/P228R (subrayadas en la **SEQ ID NO: 288**, a continuación); un dominio CH2-CH3 de IgG1 variante que comprende las sustituciones L234A/L235A/L409R (subrayadas en la **SEQ ID NO: 288**, a continuación) y que carece del residuo C-terminal; y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena polipeptídica de BSAB A es (**SEQ ID NO: 288**):

```

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLEWMGW
INTYTGESTY ADDFEGRFVF SMDTSASTAY LQISSLKAED TAVYYCARES
LYDYYSM DYW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFAVLQSS GLYLSVTV VPSSSLGTQT
YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP KSCRKTHTCP RCPAPEAAGG PSVFLFPPKPK
KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV
LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

```


La cuarta cadena polipeptídica de BSAB A comprende, en la dirección N-terminal a C-terminal: un extremo N-terminal; un dominio VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a LAG-3 (VL_{LAG-3} hLAG-3 mAb 1 VL4) (**SEQ ID NO: 54**); un dominio CL de Kappa (**SEQ ID NO: 8**) y un extremo C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de la cuarta cadena polipeptídica de BSAB A es (**SEQ ID NO: 289**):

DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSSQSLL HSDAKTYLNW LLQKPGQPPE
 RLIYLVSELD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTTHFP
 YTFGGGKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

IX. Anticuerpos de referencia

A. Anticuerpos anti-PD-1 humana de referencia

Para evaluar y caracterizar las nuevas moléculas de unión a PD-1 antihumanas de la presente divulgación, se emplearon los siguientes anticuerpos de referencia: nivolumab (también conocido como 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106, y comercializado como OPDIVO® por Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo de IgG4 humano designado en la presente como "**PD-1 mAb A**"; y pembrolizumab (anteriormente conocido como lambrolizumab, también conocido como MK-3475, SCH-900475, y comercializado como KEYTRUDA® por Merck) un anticuerpo de IgG4 humanizado designado en la presente como

"PD-1 mAb B."

1. Nivolumab ("PD-1 mAb A")

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de **PD-1 mAb A** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 64**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGTLVTVSS

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del **PD-1 mAb A** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 65**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRTGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIK

2. Pembrolizumab ("PD-1 mAb B")

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del **PD-1 mAb B** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 66**) (los residuos de CDR_H se muestran subrayados):

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTITVTVSS

La secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del **PD-1 mAb B** tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO: 67**) (los residuos de CDR_L se muestran subrayados):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL
 LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
TFGGGGTKVEIK

X. Métodos de producción

Pueden crearse un polipéptido anti-PD-1 humana y otros agonistas, antagonistas y moduladores de PD-1 a partir de los polinucleótidos y/o secuencias de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, sintética o recombinantemente. Un método para producir tales agonistas, antagonistas y moduladores de péptidos implica la síntesis química del polipéptido, seguido de tratamiento en condiciones oxidantes apropiadas para obtener la conformación nativa, es decir, los enlaces de enlace disulfuro correctos. Esto puede lograrse usando metodologías bien conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Kelley, R. F. et al. (1990) In: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M et al. (1984) SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; ver también las Patentes de Estados Unidos N° 4.105.603; 3.972.859; 3.842.067; y 3.862.925).

Los polipéptidos de la divulgación pueden prepararse convenientemente usando síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

En otra alternativa más, pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos que tienen una o más de las CDR de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15, o que compiten con PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, para la unión a PD-1 humana o una forma soluble de la misma mediante el uso de ratones disponibles comercialmente que han sido modificados para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. También pueden usarse animales transgénicos que están diseñados para producir un producto más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o una respuesta inmunitaria más robusta para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de dicha tecnología son XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) y HUMAB-MOUSE® y TC MOUSE™ (ambos de Medarex, Inc., Princeton, NJ).

Como alternativa, los anticuerpos pueden elaborarse de manera recombinante y expresarse usando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos pueden elaborarse de manera recombinante aislando primero los anticuerpos elaborados a partir de animales huésped, obteniendo la secuencia del gen y usando la secuencia del gen para expresar el anticuerpo de manera recombinante en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro método que puede emplearse es expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito métodos adecuados para expresar anticuerpos de manera recombinante en plantas o leche (ver, por ejemplo, Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Int. Rev. Immunol 13:65-93; and Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," J. Immunol Methods 231:147-157). En la técnica se conocen métodos adecuados para elaborar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc. En otra alternativa, los anticuerpos pueden elaborarse de manera recombinante mediante tecnología de presentación de fagos (ver, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; 6.265.150; y Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

Los anticuerpos o la proteína de interés pueden someterse a secuenciación mediante degradación de Edman, que es bien conocida por los expertos en la técnica. La información de péptidos generada a partir de espectrometría de masas o degradación de Edman puede usarse para diseñar sondas o cebadores que se usan para clonar la proteína de interés.

Un método alternativo de clonación de la proteína de interés es mediante "inmunoadsorción" usando PD-1 purificado o porciones del mismo para células que expresan un anticuerpo o proteína de interés que posee una o más de las CDR de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, o de un anticuerpo que compite con PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, para la unión a PD-1 humana. El procedimiento de "inmunoadsorción" puede realizar obteniendo una biblioteca de ADNc de tejidos o células que expresan PD-1, sobreexpresando los ADNc en un segundo tipo de célula, y seleccionando las células transfectadas del segundo tipo de célula para una unión específica a PD-1 en presencia o ausencia de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15. EN la técnica pueden encontrarse descripciones detalladas de los métodos usados en la clonación de genes de mamíferos que codifican las proteínas de la superficie celular mediante "inmunoadsorción" (ver, por ejemplo, Aruffo, A. et al. (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 y Stephan, J. et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In

Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation," Endocrinol. 140:5841-5854).

Los vectores que contienen polinucleótidos de interés pueden introducirse en la célula huésped mediante cualquiera de varios medios apropiados, incluyendo electroporación, transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (por ejemplo, cuando el vector es un agente infeccioso como el virus vaccinia). La elección de introducir vectores o polinucleótidos dependerá a menudo de las características de la célula huésped.

Puede usarse cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogos con el propósito de aislar los genes que codifican el anticuerpo, polipéptido o proteína de interés. Los ejemplos no limitativos de células huésped de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células COS, HeLa y CHO. Preferiblemente, las células huésped expresan los ADNc a un nivel aproximadamente 5 veces más alto, más preferiblemente 10 veces más alto, incluso más preferiblemente 20 veces más alto que el del anticuerpo o proteína endógena de interés correspondientes, si están presente, en las células huésped. La selección de las células huésped para una unión específica a PD-1 se efectúa mediante un inmunoensayo o FACS. Puede identificarse una célula que sobreexpresa el anticuerpo o la proteína de interés.

La divulgación incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de los anticuerpos de esta divulgación. Los polipéptidos de esta divulgación pueden elaborarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse mediante degradación proteolítica o de otro tipo de los anticuerpos, mediante métodos recombinantes (es decir, polipéptidos únicos o de fusión) como se ha descrito anteriormente o mediante síntesis química. Los polipéptidos de los anticuerpos, especialmente los polipéptidos más cortos de hasta aproximadamente 50 aminoácidos, se elaboran convenientemente mediante síntesis química. Los métodos de síntesis química son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Por ejemplo, un polipéptido anti-PD-1 humana podría producirse mediante un sintetizador de polipéptidos automatizado empleando el método de fase sólida.

La divulgación incluye variantes de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15 y sus fragmentos polipeptídicos que se unen a PD-1, incluyendo anticuerpos funcionalmente equivalentes y polipéptidos de fusión que no afectan significativamente a las propiedades de tales moléculas, así como variantes que tienen actividad mejorada o disminuida. La modificación de polipéptidos es una práctica rutinaria en la técnica y no es necesario describirla con detalle en la presente. Los ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más delecciones o adiciones de aminoácidos que no cambian significativamente de manera perjudicial la actividad funcional, o el uso de análogos químicos. Los residuos de aminoácidos que pueden sustituirse de manera conservadora entre sí incluyen, pero no se limitan a: glicina/alanina; serina/treonina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina. Estos polipéptidos también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones postraduccionales como, por ejemplo, glicosilación con diferentes azúcares, acetilación y fosforilación. Preferiblemente, las sustituciones de aminoácidos serían conservadoras, es decir, el aminoácido sustituido poseería propiedades químicas similares a las del aminoácido original. Tales sustituciones conservadoras son conocidas en la técnica y se han proporcionado ejemplos con anterioridad. Las modificaciones de aminoácidos pueden variar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta el rediseño completo de una región, como el dominio variable. Los cambios en el dominio variable pueden alterar la afinidad y/o especificidad de unión. Otros métodos de modificación incluyen el uso de técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Pueden usarse modificaciones, por ejemplo, para la unión de marcadores para inmunoensayo, como la unión de fracciones radiactivas para radioinmunoensayo. Los polipéptidos modificados se elaboran usando procedimientos establecidos en la técnica y pueden seleccionarse usando ensayos estándar conocidos en la técnica.

La divulgación abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más de los polipéptidos o anticuerpos PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15 de esta divulgación. En un caso, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende una cadena ligera, una cadena pesada o tanto una cadena ligera como una pesada. En otro caso, el polipéptido de fusión contiene una región constante de inmunoglobulina heteróloga. En otro caso, el polipéptido de fusión contiene un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado públicamente. Para propósitos de esta divulgación, una proteína de fusión de un anticuerpo contiene uno o más dominios de polipéptidos que se unen específicamente a PD-1 y otra secuencia de aminoácidos a la que no se une en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de otra región.

XI. Usos de las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación

La presente divulgación abarca composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación (por ejemplo, anticuerpos anti-PD-1, diacuerpos biespecíficos anti-PD-1, etc.), polipéptidos derivados de tales moléculas, polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican tales moléculas o polipéptidos, y otros agentes como se describe en la presente.

A. Usos terapéuticos

Como se ha analizado anteriormente, PD-1 desempeña un papel importante en la regulación negativa de la proliferación, función y homeostasis de las células T. Ciertas moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación tienen la capacidad de inhibir la función de PD-1 y, por tanto, revertir la inhibición del sistema inmunitario mediada por PD-1. Como tal, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 y PD-1 mAb 15, sus derivados humanizados y moléculas que comprenden sus fragmentos de unión a PD-1 (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos biespecíficos (incluyendo, pero no limitados a, DART-A, DART-B, DART-C, DART-D, DART-E, DART-F, DART-G, DART-H, DART-I y DART-J), etc.), o que compiten por la unión con tales anticuerpos, pueden usarse para bloquear la inhibición del sistema inmunitario mediada por PD-1 y, de ese modo, promover la activación del sistema inmunitario.

Tales moléculas de unión a PD-1 biespecíficas de la presente divulgación que se unen a PD-1 y a otra molécula implicada en la regulación de un punto de control inmune presente en la superficie celular (por ejemplo, LAG-3) aumentan el sistema inmunitario bloqueando la inhibición del sistema inmunitario mediada por PD-1 y tales moléculas de punto de control inmunológico. Por tanto, tales moléculas de unión a PD-1 de la divulgación son útiles para aumentar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, la respuesta inmunitaria mediada por células T) de un sujeto. En particular, tales moléculas de unión a PD-1 de la divulgación pueden usarse para tratar cualquier enfermedad o afección asociada con un sistema inmunitario indeseablemente suprimido, incluyendo el cáncer y las enfermedades que están asociadas con la presencia de un patógeno (por ejemplo, una bacteria, infección por hongos, virus o protozoos).

Los cánceres que pueden ser tratados por tales moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación incluyen cánceres caracterizados por la presencia de una célula cancerosa seleccionada del grupo que consiste de una célula de: un tumor de la glándula suprarrenal, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, tumores del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello uterino, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de células renales cromóforas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ossium de fibrogénesis imperfecta, una displasia fibrosa de hueso, un cáncer de vesícula biliar o de vías biliares, un cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroides, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina nerviosa periférica, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejidos blandos, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides y un cáncer de útero.

En particular, tales moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación pueden usarse en el tratamiento de cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas y cáncer de recto.

Las enfermedades asociadas a patógenos que pueden tratarse mediante tales moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación incluyen infecciones crónicas víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias. Las infecciones crónicas que pueden ser tratadas por las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación incluyen el virus de Epstein Barr, el virus de la hepatitis A (HAV); virus de la hepatitis B (VHB); virus de la hepatitis C (VHC); virus del herpes (por ejemplo, HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la estomatitis vesicular (VSV), *Bacilli*, *Citrobacter*, *Cholera*, *Diphtheria*, *Enterobacter*, *Gonococci*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Meningococci*, micobacteria, *Pseudomonas*, *Pneumococci*, bacteria rickettsia, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Tetanus*, *Aspergillus* (fumigatus, niger, etc.), *Blastomyces dermatitidis*, *Candida* (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, etc.), *Cryptococcus neoformans*, Genus *Mucorales* (mucor, absidia, rhizopus), *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis*, *Borrelia burgdorferi*, helminth parasite (hookworm, tapeworms, flukes, flatworms (e.g. *Schistosoma*),

Giardia lamblia, *trichinella*, *Dientamoeba Fragilis*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, y *Leishmania donovani*.

Tales moléculas de unión a PD-1 de la divulgación pueden combinarse con otros agentes anticancerígenos, en particular, moléculas que se unen específicamente a un antígeno del cáncer (por ejemplo, anticuerpos, diacuerpos). Las terapias contra el cáncer que pueden combinarse con las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación incluyen moléculas que se unen específicamente a uno más de los antígenos del cáncer incluyendo:

19.9 como se encuentra en el cáncer de colon, mucinas del cáncer gástrico; **4.2**; **A33** (un antígeno de carcinoma colorrectal; Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov; 33(8): 991-998); **ADAM-9** (Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0172350; Publicación de PCT N° WO 06/084075); **AH6** como se encuentra en cáncer gástrico; **ALCAM** (Publicación de PCT N° WO 03/093443); **APO-1 (antígeno de linfocito humano maligno)** (Trauth et al. (1989) "Monoclonal Antibody-Mediated Tumor Regression By Induction Of Apoptosis, " Science 245:301-304); **B1** (Egloff, A.M. et al. 2006, Cancer Res. 66(1):6-9); **B7-H3** (Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands", Genome Biol. 6:223.1-223.7). Chapoval, A. et al. (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production", Nature Immunol. 2:269-274; Sun, M. et al. (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes", J. Immunol. 168:6294-6297); **BAGE** (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); **beta-catenina** (Prange W. et al. 2003 J Pathol. 201(2):250-9); **grupo sanguíneo ALe^b/Le^y** como se encuentra en el adenocarcinoma de colon; **antígeno de linfoma de Burkitt-38.13**, **C14** como se encuentra en el adenocarcinoma de colon; **CA125 (antígeno de carcinoma de ovario)** (Bast, R.C. Jr. et al. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Suppl 3:274-81; Yu et al. (1991) "Coexpression Of Different Antigenic Markers On Moieties That Bear CA 125 Determinants", Cancer Res. 51(2):468-475); **Carboxipeptidasa M** (Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0166291); **CD5** (Calin, G.A. et al. 2006 Semin Oncol. 33(2):167-73; **CD19** (Ghetie et al. (1994) "Anti-CD19 Inhibits The Growth Of Human B-Cell Tumor Lines In Vitro And Of Daudi Cells In SCID Mice By Inducing Cell Cycle Arrest", Blood 83:1329-1336; Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4): 139-48); **CD20** (Reff et al. (1994) "Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20", Blood 83:435-445; Thomas, D.A. et al. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); **CD22** (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18(3):E532-51); **CD23** (Rosati, S. et al. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5:294:91-107); **CD25** (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); **CD27** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD28** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD33** (Sgouros et al. (1993) "Modeling And Dosimetry Of Monoclonal Antibody M195 (Anti-CD33) In Acute Myelogenous Leukemia, " J. Nucl. Med. 34:422-430); **CD36** (Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7); **CD40/CD154** (Messmer, D. et al. 2005 Ann NY Acad Sci. 1062:51-60); **CD45** (Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); **CD56** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD46** (Patente de Estados Unidos N° 7.148.038; Publicación de PCT N° WO 03/032814); **CD52** (Eketorp, S.S. et al. (2014) "Alemtuzumab (Anti-CD52 Monoclonal Antibody) As Single-Agent Therapy In Patients With Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL)-A Single Region Experience On Consecutive Patients", Ann Hematol. 93(10):1725-1733; Suresh, T. et al. (2014) "New Antibody Approaches To Lymphoma Therapy", J. Hematol. Oncol. 7:58; Hoelzer, D. (2013) "Targeted Therapy With Monoclonal Antibodies In Acute Lymphoblastic Leukemia", Curr. Opin. Oncol. 25(6):701-706); **CD56** (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); **CD79a/CD79b** (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48; Chu, P.G. et al. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106); **CD103** (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); **CD317** (Kawai, S. et al. (2008) "Interferon-A Enhances CD317 Expression And The Antitumor Activity Of Anti-CD317 Monoclonal Antibody In Renal Cell Carcinoma Xenograft Models", Cancer Science 99(12):2461-2466; Wang, W. et al. (2009) HM1.24 (CD317) Is A Novel Target Against Lung Cancer For Immunotherapy Using Anti-HM1.24 Antibody", Cancer Immunology, Immunotherapy 58(6):967-976; Wang, W. et al. (2009) "Chimeric And Humanized Anti-HM1.24 Antibodies Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against Lung Cancer Cells. Lung Cancer", 63(1):23-31; Sayeed, A. et al. (2013) "Aberrant Regulation Of The BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation And Apoptosis Evasion In High Grade Breast Cancer Cells", PLoS ONE 8(6):e67191, pp. 1-10); **CDK4** (Lee, Y.M. et al. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); **CEA** (carcinoembryonic antigen; Foon et al. (1995) "Immune Response To The Carcinoembryonic Antigen In Patients Treated With An Anti-Idiotypic Antibody Vaccine, " J. Clin. Invest. 96(1):334-42); Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. et al. 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9); **CEACAM9/CEACAM6** (Zheng, C. et al. (2011) "A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity", PLoS One 6(6):e21146, pp. 1-11); **CO17-1A** (Ragnhammar et al. (1993) "Effect Of Monoclonal Antibody 17-1A And GM-CSF In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma - Long-Lasting, Complete Remissions Can Be Induced, " Int. J. Cancer 53:751-758); **CO-43** (grupo sanguíneo Le^b); **CO-514** (grupo sanguíneo Le^a) como se encuentra en el adenocarcinoma; **CTA-1**; **CTLA-4** (Peggs, K.S. et al. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); **Citoqueratina 8** (Publicación de PCT N° WO 03/024191); **D1.1**; **D156-22**; **DR5** (Abdulghani, J. et al. (2010) "TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics", Expert Opin. Ther. Targets 14(10): 1091-1108; Andera, L. (2009) "Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family", Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub. 153(3): 173-180; Carlo-Stella, C. et al. (2007) "Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy", Clin. Cancer 13(8):2313-2317; Chaudhari, B.R. et al. (2006) "Following the TRAIL to Apoptosis", Immunologic Res. 35(3):249-262); serie **E₁** (grupo sanguíneo B) como se encuentra en el cáncer de páncreas; **EGFR** (Receptor del factor de crecimiento epidérmico; Adenis, A. et al. 2003 Bull Cancer. 90 Spec No:S228-32); **receptores de efrina** (y en particular **EphA2** (Patente de Estados Unidos N° 7.569.672; Publicación de PCT N° WO 06/084226); **Erb** (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. et al. 2002 Oncogene 21(57):8732-8740; Rimon, E. et al. 2004 Int J Oncol. 24(5): 1325-1338); **GAGE** (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. et al. 2006 Int J Cancer. 118(1): 123-128); **GD2/GD3/GM2** (Livingston, P.O. et al. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-1025);

gangliósido GD2 (GD₂; Saleh et al. (1993) "Generation Of A Human Anti-Idiotypic Antibody That Mimics The GD2 Antigen, " J.Immunol., 151, 3390-3398); **gangliósido GD3** (GD₃; Shitara et al. (1993) "A Mouse/Human Chimeric Anti-(Ganglioside GD3) Antibody With Enhanced Antitumor Activities", Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380); **gangliósido GM2** (GM₂; Livingston et al. (1994) "Improved Survival In Stage III Melanoma Patients With GM2 Antibodies: A Randomized Trial Of Adjuvant Vaccination With GM2 Ganglioside", J. Clin. Oncol. 12:1036-1044); **gangliósido GM3** (GM₃; Hoon et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Human Monoclonal Antibody Reactive To Ganglioside GM3 Antigen On Human Cancers, " Cancer Res. 53:5244-5250); **GICA 19-9** (Herlyn et al. (1982) "Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma, " J. Clin. Immunol. 2:135-140); **gp100** (Lotem, M. et al. 2006 J Immunother. 29(6):616-27); **Gp37** (antígeno de células T de leucemia humana; Bhattacharya-Chatterjee et al. (1988) "Idiotypic Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotypic Cascade (Abl, Ab2, and Ab3), " J. Immunol. 141:1398-1403); **gp75** (antígeno de melanoma; Vijayasardahl et al. (1990) "The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product, " J. Exp. Med. 171(4):1375-1380); **gpA33** (Heath, J.K. et al. (1997) "The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 94(2):469-474; Ritter, G. et al. (1997) "Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium", Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686; Wong, N.A. et al. (2006) "EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia", J. Clin. Pathol. 59(3):260-263); **antígeno HER2** (HER2/neu, p185^{HER2}; Kumar, Pal S et al. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); **HMFG** (antígeno de glóbulos de grasa de la leche materna; WO1995015171); **virus del papiloma humano-E6/virus del papiloma humano-E7** DiMaio, D. et al. 2006 Adv Virus Res. 66:125-59; **HMW-MAA** (high molecular weight melanoma antigen; Natali et al. (1987) "Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance, " Cancer 59:55-63; Mittelman et al. (1990) "Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Anti-idiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies", J. Clin. Invest. 86:2136-2144); **antígeno I** (antígeno de diferenciación; Feizi (1985) "Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens", Nature 314:53-57); **IL13Ra2** (Publicación de PCT N° WO 2008/146911; Brown, C.E. et al. (2013) "Glioma IL13Ra2 Is Associated With Mesenchymal Signature Gene Expression And Poor Patient Prognosis", PLoS One. 18;8(10):e77769; Barderas, R. et al. (2012) "High Expression Of IL-13 Receptor A2 In Colorectal Cancer Is Associated With Invasion, Liver Metastasis, And Poor Prognosis", Cancer Res. 72(11):2780-2790; Kasaian, M.T. et al. (2011) "IL-13 Antibodies Influence IL-13 Clearance In Humans By Modulating Scavenger Activity Of IL-13Ra2", J. Immunol. 187(1):561-569; Bozinov, O. et al. (2010) "Decreasing Expression Of The Interleukin-13 Receptor IL-13Ra2 In Treated Recurrent Malignant Gliomas", Neurol. Med. Chir. (Tokyo) 50(8):617-621; Fujisawa, T. et al. (2009) "A novel role of interleukin-13 receptor alpha2 in pancreatic cancer invasion and metastasis", Cancer Res. 69(22):8678-8685); **integrina β6** (Publicación de PCT N° WO 03/087340); **JAM-3** (Publicación de PCT N° WO 06/084078); **KID3** (Publicación de PCT N° WO 05/028498); **KID31** (Publicación de PCT N° WO 06/076584); **Antígeno de pancarcinoma KS 1/4** (Perez et al. (1989) "Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker, " J. Immunol. 142:3662-3667; Möller et al. (1991) "Bi-specific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes", Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216; Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-80); **L6** y **L20** (antígenos de carcinoma de pulmón humano; Hellstrom et al. (1986) "Monoclonal Mouse Antibodies Raised Against Human Lung Carcinoma", Cancer Res. 46:3917-3923); **LEA**; **LUCA-2** (Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2006/0172349; Publicación de PCT N° WO 06/083852); **M1:22:25:8**; **M18**; **M39**; **MAGE** (MAGE-1; MAGE-3; Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); **MART** (Kounalakis, N. et al. 2005 Curr Oncol Rep.7(5):377-82; **mesotelina** (Chang K, and Pastan I. 1996 "Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers", Proc Natl Acad Sci USA 93:136-40); **MUC-1** (Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46); **MUM-1** (Castelli, C. et al. 2000 J Cell Physiol. 182(3):323-31); **Myl**; **N-acetilglucosaminiltransferasa** (Dennis, J.W. 1999 Biochim Biophys Acta. 6., 1473(1):21-34); **neoglicoproteína**; **NS-10** como se encuentra en adenocarcinomas; **OFA-1**; **OFA-2**; **Oncostatina M** (receptor beta de oncostatina; Patente de Estados Unidos N° 7.572.896; Publicación de PCT N° WO 06/084092); **p15** (Gil, J. et al. 2006 Nat Rev Mol Cell Biol. 7(9):667-77); **p97** (antígeno asociado a melanoma; Estin et al. (1989) "Transfected Mouse Melanoma Lines That Express Various Levels Of Human Melanoma-Associated Antigen p97", J. Natl. Cancer Instit. 81(6):445-454); **PEM** (mucina epitelial polimórfica; Hilken et al. (1992) "Cell Membrane-Associated Mucins And Their Adhesion-Modulating Property", Trends in Biochem. Sci. 17:359-363); **PEMA** (antígeno de mucina epitelial polimórfica); **PIPA** (Patente de Estados Unidos N° 7.405.061; Publicación de PCT N° WO 04/043239); **PSA** (antígeno prostático específico; Henttu et al. (1989) "cDNA Coding For The Entire Human Prostate Specific Antigen Shows High Homologies To The Human Tissue Kallikrein Genes", Biochem. Biophys. Res. Comm. 10(2):903-910; Israeli et al. (1993) "Molecular Cloning Of A Complementary DNA Encoding A Prostate-Specific Membrane Antigen, " Cancer Res. 53:227-230; Cracco, C.M. et al. 2005 Minerva Urol Nefrol. 57(4):301-11); **PSMA** (antígeno de membrana específico de la próstata; Ragupathi, G. 2005 Cancer Treat Res. 123:157-180); **fosfato de ácido prostático** (Tailor et al. (1990) "Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone", Nucl. Acids Res. 18(16):4928); **R24** como se encuentra en melanoma; **ROR1** (Patente de Estados Unidos N° 5.843.749); **esfingolípidos**; **SSEA-1**; **SSEA-3**; **SSEA-4**; **sTn** (Holmberg, LA 2001 Expert Opin Biol Ther. 1(5):881-91); **péptido derivado del receptor de células T** de un linfoma cutáneo de células T (ver

Edelson (1998) "Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy, " *Cancer J Sci Am.* 4:62-71); **TsA7** encontrado en las células mieloides; **TAG-72** (Yokota et al. (1992) "Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms, " *Cancer Res.* 52:3402-3408); **TL5** (grupo sanguíneo A); **Receptor de TNF** (receptor de TNF- α , receptor de TNF- β ; receptor de **TNF- γ** (van Horsen, R. et al. 2006 Oncologist. 11(4):397-408; Gardnerova, M. et al. 2000 *Curr Drug Targets.* 1(4):327-64); **TRA-1-85** (grupo sanguíneo H); **receptor de transferrina** (Patente de Estados Unidos Nº 7.572.895; Publicación de PCT Nº WO 05/121179); **5T4** (TPBG, glucoproteína de trofoblasto; Boghaert, E.R. et al. (2008) The Oncofetal Protein, 5T4, Is A Suitable Target For Antibody-Guided Anti-Cancer Chemotherapy With Calicheamicin", *Int. J. Oncol.* 32(1):221-234; Eisen, T. et al. (2014) "Naptumomab Estafenatox: Targeted Immunotherapy with a Novel Immunotoxin", *Curr. Oncol. Rep.* 16:370, pp. 1-6); **TSTA (antígeno de trasplante específico de tumor)**, como los antígenos tumorales inducidos por virus, incluyendo los virus tumorales de ADN del antígeno T y los antígenos de la envoltura de los virus tumorales de ARN, el antígeno oncofetal-alfa-fetoproteína como el CEA del colon, el antígeno oncofetal del tumor de la vejiga (Hellstrom et al. (1985) "Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas, " *Cancer. Res.* 45:2210-2188); **VEGF** (Pietrantonio, F. et al. (2015) "Quimioterapia neoadyuvante basada en bevacizumab para metástasis hepáticas de cáncer colorrectal: Errores y trucos útiles en una revisión para médicos, " *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 95 (3): 272-281; Grabowski, JP (2015) "Bevacizumab-Based Neoadjuvant Chemotherapy For Colorectal Cancer Liver Metastases: Pitfalls And Helpful Tricks In A Review For Clinicians", *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 95(3):272-281; Grabowski, J.P. (2015) "Current Management Of Ovarian Cancer", *Minerva Med.* 106(3):151-156; Field, K.M. (2015) "Bevacizumab And Glioblastoma: Scientific Review, Newly Reported Updates, And Ongoing Controversies", *Cancer* 121(7):997-1007; Suh, D.H. et al. (2015) "Major Clinical Research Advances In Gynecologic Cancer In 2014", *J. Gynecol. Oncol.* 26(2):156-167; Liu, K.J. et al. (2015) "Bevacizumab In Combination With Anticancer Drugs For Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer", *Tumour Biol.* 36(3): 1323-1327; Di Bartolomeo, M. et al. (2015) "Bevacizumab treatment in the elderly patient with metastatic colorectal cancer", *Clin. Interv. Aging* 10:127-133); **Receptor de VEGF** (O'Dwyer, PJ 2006 Oncologist. 11(9):992-998); **VEP8; VEP9; VIM-D5; y hapteno Y, Le^y** como se encuentra en células de carcinoma embrionario.

En ciertos casos, tales moléculas de unión anti-PD-1 de la divulgación se usan en combinación con una o más moléculas que se unen específicamente a 5T4, B7H3, CD19, CD20, CD51, CD123, DR5, EGFR, EpCam, GD2, gpA33, HER2, ROR-1, TAG-72, anticuerpo VEGF-A y/o VEGFR2.

Tales moléculas de unión a PD-1 de la divulgación pueden combinarse con un agente inmunogénico como una vacuna contra el tumor. Tales vacunas pueden comprender antígenos tumorales purificados (incluyendo moléculas de proteínas recombinantes, péptidos y carbohidratos), células tumorales autólogas o alogénicas. Se han descrito una serie de estrategias de vacunas tumorales (ver, por ejemplo, Palena, C., et al., (2006) "Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies", *Adv. Cancer Res.* 95, 115-145; Mellman, I., et al. (2011) "Cancer immunotherapy comes of age", *Nature* 480, 480-489; Zhang, X. M. et al. (2008) "The anti-tumor immune response induced by a combination of MAGE-3/MAGE-n-derived peptides", *Oncol. Rep.* 20, 245-252; Disis, M. L. et al. (2002) "Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines", *J. Clin. Oncol.* 20, 2624-2632; Vermeij, R. et al. (2012) "Potentiation of a p53-SLP vaccine by cyclophosphamide in ovarian cancer: a single-arm phase II study." *Int. J. Cancer* 131, E670-E680). Tales moléculas de unión a PD-1 de la divulgación pueden combinarse con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58:5301-5304).

Tales moléculas de unión a PD-1 de la divulgación pueden combinarse con otras moléculas inmunoestimuladoras como anticuerpos que activan la respuesta inmunitaria del huésped para proporcionar niveles aumentados de activación de células T. En particular, se ha demostrado que los anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-CTLA-4 activan el sistema inmunitario (ver, por ejemplo, del Rio, M-L. et al. (2005) "Antibody-Mediated Signaling Through PD-1 Costimulates T Cells And Enhances CD28-Dependent Proliferation", *Eur. J. Immunol* 35:3545-3560; Barber, D. L. et al. (2006) "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", *Nature* 439, 682-687; Iwai, Y. et al. (2002) "Involvement Of PD-L1 On Tumor Cells In The Escape From Host Immune System And Tumor Immunotherapy By PD-L1 Blockade", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 12293-12297; Leach, D. R., et al., (1996) "Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade", *Science* 271, 1734-1736). Las moléculas inmunoestimuladoras adicionales que pueden combinarse con las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación incluyen anticuerpos contra moléculas en la superficie de células dendríticas que activan la función de células dendríticas (DC) y presentación de antígenos, anticuerpos anti-CD40 capaces de sustituir la actividad auxiliar de células T y anticuerpos activadores contra moléculas costimuladoras de células T como PD-L1, CTLA-4, OX-40 4-1BB, e ICOS (ver, por ejemplo, Ito et al. (2000) "Effective Priming Of Cytotoxic T Lymphocyte Precursors By Subcutaneous Administration Of Peptide Antigens In Liposomes Accompanied By Anti-CD40 And Anti-CTLA-4 Antibodies", *Immunobiology* 201:527-40; Patente de Estados Unidos Nº 5.811.097; Weinberg et al. (2000) "Engagement of the OX-40 Receptor In Vivo Enhances Antitumor Immunity", *Immunol* 164:2160-2169; Melero et al. (1997) "Monoclonal Antibodies Against The 4-1BB T-Cell Activation Molecule Eradicate Established Tumors", *Nature Medicine* 3: 682-685; Huttoff et al. (1999) "ICOS Is An Inducible T-Cell Co-Stimulator Structurally And Functionally Related To CD28", *Nature* 397: 263-266; y Moran, A.E. et al. (2013) "The TNFRs OX40, 4-14BB, and CD40 As

Targets For Cancer Immunotherapy", Curr Opin Immunol. Abril de 2013; 25(2): 10.1016/j.coi.2013.01.004), y o receptores de antígenos quiméricos (**CAR**) estimuladores que comprenden un dominio de unión a antígeno dirigido contra un antígeno de enfermedad fusionado con uno o más dominios de señalización intracelular de varios receptores de proteína scoestimuladores (por ejemplo, CD28, 4-1BB, ICOS, OX40, etc.) que sirven para estimular las células T tras unirse al antígeno (ver, por ejemplo, Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor", Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells", Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia", Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo", Leukemia doi: 10.1038/leu.2014.62).

Tales moléculas de unión a PD-1 de la divulgación pueden combinarse con receptores de antígenos quiméricos inhibidores (**iCAR**) para desviar las respuestas de inmunoterapia objetivo. iCAR es un dominio de unión a antígeno dirigido contra un antígeno de enfermedad fusionado con uno o más dominios de señalización intracelular de varios receptores de proteínas inhibitorias (por ejemplo, CTLA-4, PD-1, etc.) que sirven para restringir las respuestas de las células T tras la unión del antígeno (ver, por ejemplo, Fedorov V.D. (2013) "PD-1-and CTLA-4 BasedInhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) Divert Off-Target Immunotherapy Responses," Sci. Tranl. Med. 5:215ra172 doi:10.1126/ scitranslmed.3006597.

En particular, tales moléculas de unión anti-PD-1 de la divulgación se usan en combinación con un anticuerpo anti-CD137, un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-LAG-3, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-TIGIT, un anticuerpo anti-TIM-3 y/o una vacuna contra el cáncer.

B. Utilidad diagnóstica y teranóstica

Algunas de las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación presentan poca o ninguna capacidad para bloquear la unión entre PD-1 y el ligando PD-1L. Como tales, los anticuerpos PD-1 mAb 2 y PD-1 mAb 4, sus derivados humanizados y moléculas que comprenden sus fragmentos de unión a PD-1 (por ejemplo, diacuerpos biespecíficos, etc.) o que compiten por la unión con tales anticuerpos pueden ser marcados detectablemente (por ejemplo, con fracciones de marcado radiactivas, enzimáticas, fluorescentes, quimioluminiscentes, paramagnéticas, diamagnéticas u otras) y se usan en la detección de PD-1 en muestras o en la imagenología de PD-1 en células. Como tales moléculas no afectan a la actividad biológica de PD-1, son particularmente útiles en métodos para determinar la extensión, localización y cambio en la expresión de PD-1 en sujetos (por ejemplo, sujetos que están siendo tratados por cáncer asociado con la expresión o direccionamiento de PD-1).

XII. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la divulgación incluyen composiciones de fármacos a granel útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que pueden usarse en la preparación de formas de dosificación unitarias. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación, o una combinación de tales agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, las composiciones de la divulgación comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable. La divulgación abarca particularmente las composiciones farmacéuticas en las que la molécula de unión a PD-1 es: un PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15; un PD-1 mAb 1; PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15 humanizado; un fragmento de unión a PD-1 de cualquiera de tales anticuerpos; o en el que la molécula de unión a PD-1 es un diacuerpo PD-1 biespecífico (por ejemplo, un diacuerpo biespecífico PD-1 x LAG-3). Se incluyen especialmente las moléculas que comprenden las 3 CDR_L y las 3 CDR_H de anticuerpo PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15; un PD-1 mAb 1; PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15 humanizado.

La divulgación también abarca tales composiciones farmacéuticas que incluyen adicionalmente un segundo anticuerpo terapéutico (por ejemplo, anticuerpo monoclonal específico de tumor) que es específico para un antígeno de cáncer particular y un portador vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un caso específico, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea

generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la divulgación se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

Las composiciones de la divulgación pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las formadas con aniones como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

La divulgación también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con una molécula de unión a PD-1 de la presente divulgación (y más preferiblemente, un PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15; un anticuerpo PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, o PD-1 mAb 15 humanizado; un fragmento de unión a PD-1 de cualquiera de tales anticuerpos; o en el que la molécula de unión a PD-1 es un diacuerpo de PD-1 biespecífico (por ejemplo, un diacuerpo biespecífico de PD-1 x LAG-3)). Se abarcan especialmente las moléculas que comprenden las 3 CDR_Ls y las 3 CDR_Hs de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14 o PD-1 mAb 15, solas o con dicho portador farmacéuticamente aceptable. Además, también pueden incluirse en el paquete o kit farmacéutico uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos útiles para el tratamiento de una enfermedad. La divulgación también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Opcionalmente asociado con dicho recipiente(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o biológicos, tal aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

La presente divulgación proporciona kits que pueden usarse en los métodos anteriores. Un kit puede comprender cualquiera de las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación. El kit puede comprender además uno o más de otros agentes profilácticos y/o terapéuticos útiles para el tratamiento del cáncer, en uno o más recipientes; y/o el kit puede comprender además uno o más anticuerpos citotóxicos que se unen a uno o más antígenos del cáncer asociados con el cáncer. En ciertos casos, el otro agente profiláctico o terapéutico es un agente quimioterapéutico. En otros casos, el agente profiláctico o terapéutico es un agente terapéutico biológico u hormonal.

XIII. Métodos de administración

Las composiciones de la presente divulgación pueden proporcionarse para el tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de una proteína de fusión o una molécula conjugada de la divulgación, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la divulgación. En un aspecto preferido, tales composiciones están sustancialmente purificadas (es decir, sustancialmente libres de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En un caso específico, el sujeto es un animal, preferiblemente un mamífero como un no primate (por ejemplo, bovino, equino, felino, canino, roedor, etc.) o un primate (por ejemplo, mono como, un mono cynomolgus, humano, etc.). En un caso preferido, el sujeto es un humano.

Se conocen varios sistemas de administración y pueden usarse para administrar las composiciones de la divulgación, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo, Wu et al., (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc.

Los métodos de administración de una molécula de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosal (por ejemplo, vías intranasal y oral). En un caso específico, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante. Ver, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y Publicaciones de PCT N° WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903.

La divulgación también establece que las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación se envasan en un recipiente herméticamente sellado como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de la molécula. En un caso, tales moléculas se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado y pueden reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. Preferiblemente, las moléculas de unión a PD-1 de la presente divulgación se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente sellado.

Las moléculas de unión a PD-1 liofilizadas de la presente divulgación deben almacenarse a entre 2° C y 8° C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse dentro de las 12 horas, preferiblemente en el plazo de 6 horas, en el plazo de 5 horas, en el plazo de 3 horas., o en el plazo de 1 hora después de ser reconstituido. En un caso alternativo, tales moléculas se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indica la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión o molécula conjugada. Preferiblemente, tales moléculas de unión a PD-1, cuando se proporcionan en forma líquida, se suministran en un recipiente herméticamente sellado.

La cantidad de la composición de la divulgación que será eficaz en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más síntomas asociados con un trastorno puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que se empleará en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la afección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de las curvas de respuesta a las dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o in vitro.

Como se usa en la presente, una "**cantidad eficaz**" de una composición farmacéutica, en un caso, es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados que incluyen, sin limitación, resultados clínicos como la disminución de los síntomas resultantes de la enfermedad, la atenuación de un síntoma de infección (por ejemplo, carga viral, fiebre, dolor, sepsis, etc.) o un síntoma de cáncer (por ejemplo, la proliferación de células cancerosas, presencia de tumores, metástasis tumorales, etc.), aumentando de este modo la calidad de vida de quienes padecen la enfermedad, disminuyendo la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, potenciando el efecto de otro medicamento, por ejemplo, a través del direccionamiento y/o internalización, retrasando la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los propósitos de esta divulgación, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para reducir la proliferación (o el efecto de) la presencia viral y para reducir y/o retrasar el desarrollo de la enfermedad viral, ya sea directa o indirectamente. En algunos casos, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede lograrse o no junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por tanto, una "cantidad eficaz" puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes quimioterapéuticos, y puede considerarse que un solo agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más de otros agentes, puede lograrse o se logra un resultado deseable. Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades efectivas de cada componente está dentro del conocimiento de la técnica.

Para las moléculas de unión a PD-1 abarcadas por la divulgación, la dosificación administrada a un paciente se determina preferiblemente en base al peso corporal (kg) del sujeto receptor. Para las moléculas de unión a PD-1 abarcadas por la divulgación, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de por lo menos aproximadamente 0,01 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,05 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,1 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,2 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,5 µg/kg, por lo menos

aproximadamente 1 µg/kg, por lo menos aproximadamente 2 µg/kg, por lo menos aproximadamente 5 µg/kg, por lo menos aproximadamente 10 µg/kg, por lo menos aproximadamente 20 µg/kg, por lo menos aproximadamente 50 µg/kg, por lo menos aproximadamente 0,1 mg/kg, por lo menos aproximadamente 1 mg/kg, por lo menos aproximadamente 3 mg/kg, por lo menos aproximadamente 5 mg/kg, por lo menos aproximadamente 10 mg/kg, en
 5 por lo menos aproximadamente 30 mg/kg, por lo menos aproximadamente 50 mg/kg, por lo menos aproximadamente 75 mg/kg, por lo menos aproximadamente 100 mg/kg, por lo menos aproximadamente 125 mg/kg, por lo menos aproximadamente 150 mg/kg o más del peso corporal del sujeto.

La dosificación y la frecuencia de administración de una molécula de unión a PD-1 de la presente
 10 divulgación pueden reducirse o alterarse mejorando la captación y la penetración tisular de la molécula mediante modificaciones como, por ejemplo, lipidación.

La dosificación de una molécula de unión a PD-1 de la divulgación administrada a un paciente puede
 15 calcularse para su uso como terapia con un agente individual. Alternativamente, la molécula puede usarse en combinación con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente es menor que cuando dichas moléculas se usan como terapia con un agente individual.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse localmente en el área que
 20 necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local, por inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, como membranas o fibras sialásticas. Preferiblemente, cuando se administra una molécula de la divulgación, se debe tener cuidado de usar materiales en los que no se absorba la molécula.

Las composiciones de la divulgación pueden administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver
 25 Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., in LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE AND CANCER, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327).

Las composiciones de la divulgación pueden administrarse en un sistema de liberación controlada o de
 30 liberación sostenida. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden una o más de las moléculas de unión a PD-1 de la divulgación. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.526.938; Publicación de PCT WO 91/05548; Publicación de PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel, " Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody
 35 Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions, " PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application, "Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery, " Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760. En un caso, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (ver Langer, *supra*;
 40 Sefton, (1987) "Implantable Pumps, " CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," Surgery 88:507-516; y Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery,"N. Engl. J. Med. 321:574-579). En otro caso, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada de las moléculas (ver, por ejemplo,
 45 MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate, " Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization, " Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989)
 50 "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits, " J. Neurosurg. 7(1): 105-112); Patente de Estados Unidos N° 5.679.377; Patente de Estados Unidos N° 5.916.597; Patente de Estados Unidos N° 5.912.015; Patente de Estados Unidos N° 5.989.463; Patente de Estados Unidos N° 5.128.326; Publicación de PCT N° WO 99/15154; y Publicación de PCT N° WO 99/20253). Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(acetato de etilen-co-vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA), y poliortoésteres. Puede colocarse un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico (por
 55 ejemplo, los pulmones), por lo que solo se requiere una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo, Goodson, en MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Las composiciones poliméricas útiles como implantes de liberación controlada pueden usarse de acuerdo con Dunn et al. (Ver US 5,945,155). Este método particular se basa en el efecto terapéutico de la liberación controlada in situ del material bioactivo del sistema polimérico. La implantación puede producirse generalmente en cualquier parte del cuerpo del paciente con necesidad de tratamiento terapéutico. Puede usarse un sistema de administración sostenida no
 60 polimérico, mediante el cual se usa un implante no polimérico en el cuerpo del sujeto como sistema de administración de fármacos. Tras la implantación en el cuerpo, el solvente orgánico del implante se disipará,

dispersará o lixiviará de la composición al fluido tisular circundante, y el material no polimérico se coagulará o precipitará gradualmente para formar una matriz microporosa sólida (ver US 5.888.533).

Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la divulgación. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.526.938; Publicaciones internacionales N° WO 91/05548 y WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel, " Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions, " PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application, " Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; y Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery, " Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760.

Cuando la composición de la divulgación es un ácido nucleico que codifica una molécula de unión a PD-1 de la presente divulgación, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su molécula de unión a PD-1 codificada construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrarlo de manera que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (Ver Patente de Estados Unidos N° 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola genética; Biolistic, Dupont), o recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo en unión a un péptido tipo homeobox que se sabe que entra en el núcleo (Ver por ejemplo, Joliot et al (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), etc. Alternativamente, un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión mediante recombinación homóloga.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una molécula de unión a PD-1 de la presente divulgación puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto es tratado con dicho diacuerpo una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferiblemente entre 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 a 7 semanas, e incluso más preferiblemente durante aproximadamente 4, 5 o 6 semanas. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran varios métodos para composiciones en los métodos de diagnóstico o tratamiento de la divulgación. Se pretende que los ejemplos ilustren, pero de ninguna manera limiten, el alcance de la divulgación.

Ejemplo 1

Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 humana

Se aislaron quince anticuerpos monoclonales murinos por ser capaces de unirse específicamente a PD-1 tanto humana como de mono cynomolgus, y se les asignó las designaciones "PD-1 mAb 1," "PD-1 mAb 2," "PD-1 mAb 3," "PD-1 mAb 4," "PD-1 mAb 5," "PD-1 mAb 6," "PD-1 mAb 7," "PD-1 mAb 8," "PD-1 mAb 9," "PD-1 mAb 10," "PD-1 mAb 11," "PD-1 mAb 12," "PD-1 mAb 13," "PD-1 mAb 14," y "PD-1 mAb 15." Se descubrió que las CDR de estos anticuerpos difieren y se han proporcionado con anterioridad. La unión al dominio extracelular de PD-1 humana y de mono cynomolgus se evaluó de la siguiente manera, se recubrieron placas maxisorb de 96 pocillos de fondo plano con PD-1 soluble humana o de mono cynomolgus (el dominio extracelular de PD-1 humana fusionado a una etiqueta His (shPD-1 His) o una región Fc humana (shPD-1 hFc), o el dominio extracelular de PD-1 de mono cynomolgus fusionado a una región Fc humana (scyno-PD1 Fc)) cada uno a 0,5 o 1 µg/ml, las placas se lavaron e incubaron con uno de los anticuerpos anti-PD-1 aislados PD-1 mAb 1-15. Para estos estudios, los anticuerpos anti-PD-1 se utilizaron a 3, 1,0, 0,3333, 0,1111, 0,0370, 0,0123 o 0,0041 µg/ml (diluciones en serie de tres veces). La cantidad de anticuerpo que se une a PD-1 inmovilizada (humana o de mono cynomolgus) se evaluó usando un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG-HRP de ratón. Todas las muestras se analizaron en un lector de placas (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers). Las curvas de unión representativas para PD-1 de cynomolgus soluble y humana soluble se muestran en las **Figuras 7A-7D** y las **Figuras 8A-8C**, respectivamente.

Los resultados de estos ensayos de unión (**Figuras 7A-7D** y **Figuras 8A-8C**) muestran que todos los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15 se unen tanto a PD-1 humana soluble como a de mono cynomolgus soluble.

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos anti-PD-1 murinos, se evaluó su capacidad para bloquear

la unión de PD-L1 humana soluble a PD-1 humana soluble en dos ensayos diferentes. En un ensayo, se examinó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de PD-1 humana a PD-L1 inmovilizado en una superficie. Para este ensayo, cada uno de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15, o un anticuerpo anti-PD-1 de referencia (PD-1 mAb A) se mezcló con la proteína de fusión shPD-1 His, (a 2,5 µg/ml) y se incubó por separado con PD-L1 humano soluble marcado con biotina (el dominio extracelular de PD-L1 fusionado con Fc humano (sPD-L1)) a 1 µg/ml inmovilizado en una placa recubierta con estreptavidina. Para estos estudios, los anticuerpos anti-PD-1 se utilizaron a 10, 5,0, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 o 0,1563 µg/ml (diluciones en serie dos veces). La cantidad de shPD-1 His que se une al sPD-L1 inmovilizado se evaluó mediante el His-Tag usando un anticuerpo secundario anti-His-Tag-HRP. Todas las muestras se analizaron en un lector de placas (Victor 2 Wallac, Perkin Elmers). Los resultados de este experimento se muestran en las **Figuras 9A-9D**.

Los resultados de estos ensayos de inhibición (**Figuras 9A-9D**) muestran que los anticuerpos anti-PD PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 8, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, y PD-1 mAb 15, fueron capaces de bloquear la unión de PD-L1 humano soluble a PD-1 humana soluble en varios grados mientras que PD-1 mAb 2 y PD-1 mAb 4 mostraron poca o ninguna actividad de bloqueo en este formato de ensayo.

En el segundo ensayo, se ensayó la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 murinos PD-1 mAb 1-15 para bloquear la unión del ligando PD-1 (es decir, PD-L1 humana o PD-L2 humana) a PD-1 expresada en la superficie de las células NSO. Para este ensayo, cada uno de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15, o un anticuerpo anti-PD-1 de referencia (PD-1 mAb A o PD-1 mAb B) se mezcló por separado con un PD-L1 humano soluble biotinilado (proteína de fusión shPD-L1) o proteína de fusión PD-L2-mulFc humana soluble biotinilada (shPD-L2; Ancell N° de Cat 573-030), cada una a 0,1 µg/prueba, y se incubaron con células NSO que expresan PD-1 humana (~250.000 células/pocillo) en tampón de bloqueo (FACS + albúmina de suero humano al 10%). Para estos estudios, los anticuerpos anti-PD-1 se utilizaron a 4,0, 1,0, 2,5 x 10⁻¹, 6,25 x 10⁻², 1,56 x 10⁻², 3,90 x 10⁻³, 9,76 x 10⁻⁴, 2,4 x 10⁻⁴, 0,6 x 10⁻⁴ µg/prueba (diluciones en serie de cuatro veces). La cantidad de unión de shPD-L1 (o shPD-L2) a la superficie de las células NSO se determinó usando un anticuerpo secundario de estreptavidina conjugado con PE mediante análisis FACS. Se determinaron los valores de IC50 para la inhibición de la unión de PD-1/PD-L1 y en la **Tabla 6** se proporciona la media de la muestra (□) de por lo menos dos experimentos (excepto donde se indique).

Tabla 6			
Anticuerpo anti-PD-1	IC50 (µg/prueba)	Anticuerpo anti-PD-1	IC50 (µg/prueba)
PD-1 mAb A	0,0044	PD-1 mAb 8	0,6611 ±
PD-1 mAb B	0,0064	PD-1 mAb 9	0.0154
PD-1 mAb 1	0,0048	PD-1 mAb 10	0,0057
PD-1 mAb 2	0.0110	PD-1 mAb 11	0,0259 ±
PD-1 mAb 3	0,0361 ±	PD-1 mAb 12	0,0238 ±
PD-1 mAb 4	0,0156 ±	PD-1 mAb 13	0.0117
PD-1 mAb 5	0,0039	PD-1 mAb 14	0,0149 ±
PD-1 mAb 6	0,0051	PD-1 mAb 15	0,0060
PD-1 mAb 7	0,0024		
± Resultados de un solo experimento			

Los resultados de los ensayos de inhibición de shPD-L1 (**Tabla 6**) muestran que los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 11, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, y PD-1 mAb 15, fueron capaces de bloquear la unión de PD-L1 humana a PD-1 humana expresada en la superficie de las células NSO. En particular, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 10 y PD-1 mAb 15 bloquearon la unión de shPD-L1 tan bien como o mejor que los anticuerpos de referencia PD-1 (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B), mientras que PD-1 mAb 8 era esencialmente no bloqueante en este formato de ensayo. Tanto PD-1 mAb 2 como PD-1 mAb 4 pudieron bloquear la unión de PD-1/PD-L1 en este formato de ensayo.

De manera similar, los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2 y PD-1 mAb 3, PD-1 mAb 4, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 10, PD-1 mAb 12, PD-1 mAb 13, PD-1 mAb 14, fueron capaces de bloquear la unión de PD-L2 humano a PD-1 humana expresada en la superficie de las células NSO, mientras que PD-1 mAb 8 era esencialmente no bloqueante en este formato de ensayo. En particular, PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 5, PD-1 mAb 6, PD-1 mAb 7 y PD-1 mAb 10 bloquearon la unión de shPD-L2 tan bien como o mejor que los anticuerpos PD-1 de referencia (PD-1 mAb A, PD-1 mAb B). Los anticuerpos de PD-1 PD-1 mAb 11 y PD-1 mAb 15 no se probaron en este ensayo. A continuación se proporcionan los resultados para varios anticuerpos anti-PD-1 humanizados que incluyen hPD-1 mAb 15.

Ejemplo 2**Humanización y caracterización adicional**

Los dominios variables de los anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 se humanizaron, donde se identificaron los epítopos antigénicos los anticuerpos se desinmunizaron adicionalmente para generar los dominios variables humanizados finales. La humanización de PD-1 mAb 1, PD-1 mAb 2 y PD-1 mAb 15 produjo un dominio VH humanizado y un dominio VL humanizado para cada anticuerpo designado en la presente como "hPD-1 mAb 1 VH1," and "hPD-1 mAb 1 VL1;" "hPD-1 mAb 2 VH1," y "hPD-1 mAb 2 VL1;" y "hPD-1 mAb 15 VH1" y "hPD-1 mAb 15 VL1". La humanización de PD-1 mAb 7 produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como "hPD-1 mAb 7 VH1",y tres dominios VL humanizados designados en la presente como "hPD-1mAb 1 VL1", "hPD-1mAb 7 VL2" y "hPD-1mAb 7 VL3". La humanización de PD-1 mAb 9 produjo dos dominios VH humanizados, designados en la presente como "hPD-1 mAb 9 VH1" y "hPD-1 mAb 9 VH2", y dos dominios VL humanizados designados en la presente como "hPD-1 mAb 9 VL1, " y "hPD-1 mAb 1 VL2". Donde se generaron múltiples dominios variables humanizados, los dominios variables humanizados de cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-PD-1 particular (por ejemplo, PD-1 mAb 7) puede usarse en cualquier combinación y las combinaciones particulares de cadenas humanizadas se denominan por referencia a los dominios VH/VL específicos, por ejemplo, a un anticuerpo humanizado que comprende hPD-1 mAb 7 VH1 y hPD-1 mAb 7 VL2 se hace referencia específicamente como "hPD-1 mAb 7 (1.2)". Se generaron anticuerpos humanizados de longitud completa con una región constante de IgG1 humana que comprende las sustituciones L234A/L235A (IgG1 (AA)) o una región constante de IgG4 humana que comprende la sustitución S228P (IgG4 (P)).

Las cadenas pesadas de anticuerpos humanizados de IgG1 de longitud completa se construyeron de la siguiente manera: el extremo C-terminal del dominio VH humanizado se fusionó con el extremo N-terminal de una región constante de IgG1 humana que tiene un dominio CH2-CH3 variante (que comprende las sustituciones L234A/L235A (AA)) y que carecen del residuo de lisina C-terminal (**SEQ ID NO: 255**):

```

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPEAAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

```

En la **SEQ ID NO: 255**, los residuos de aminoácidos 1-98 corresponden al dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**), los residuos de aminoácidos 99-113 corresponden a la región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**) y los residuos de aminoácidos 114-329 corresponden al dominio CH2-CH3 de IgG1 que comprende las sustituciones L234A/L235A (subrayadas) (**SEQ ID NO: 5**) pero que carece del residuo de lisina C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo humanizado ejemplar ((hPD-1 mAb 7 (1.2)) que tiene una región constante de la cadena pesada de IgG1 que comprende la mutación L234A/L235A y que carece del residuo de lisina C-terminal es (**SEQ ID NO: 265**):

```

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSVTVTV PSSSLGTQTY
ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAAGP SVFLFPPKPK
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVL
DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG

```

En la **SEQ ID NO: 265**, los residuos de aminoácidos 1-119 corresponden al dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1 (**SEQ ID NO: 147**), los residuos de aminoácidos 120-217 corresponden al dominio CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO: 10**), los residuos 218-232 corresponden a la región bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO: 32**) y los residuos 233-448

corresponden al dominio CH2-CH3 de IgG1 que comprende las sustituciones L234A/L235A (subrayadas) (**SEQ ID NO: 5**) pero que carece del residuo de lisina C-terminal.

Las cadenas pesadas del anticuerpo humanizado de IgG4 de longitud completa se construyeron de la siguiente manera: el extremo C-terminal del dominio VH humanizado se fusionó con el extremo N-terminal de una región constante de IgG4 humana que tiene una región bisagra estabilizada (que comprende la sustitución S228P) y que carece del residuo de lisina C-terminal (**SEQ ID NO: 256**):

```

5      ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
10     HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDRVES
      KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
15     PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
      CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
      GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSD DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
20     NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLG

```

En la **SEQ ID NO: 256**, los residuos de aminoácidos 1-98 corresponden al dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**), los residuos de aminoácidos 99-110 corresponden a la región bisagra de IgG4 estabilizada que comprende las sustituciones de S228P (subrayadas) (**SEQ ID NO: 13**) y los residuos de aminoácidos 111-326 corresponden al dominio CH2-CH3 de IgG4 (**SEQ ID NO: 4**) pero carecen del residuo de lisina C-terminal.

La secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de un anticuerpo humanizado ejemplar ((hPD-1 mAb 7 (1.2)) que tiene una región constante de cadena pesada de IgG4 que comprende una región bisagra estabilizada que tiene la mutación S228P y que carece del residuo de lisina C-terminal es (**SEQ ID NO: 266**):

```

30     QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
      IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
      YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
35     YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSVTVTV PSSSLGKTKY
      TCNVDHKPSN TKVDRVESK YGPPCPPCPA PEFLGGPSVF LFPPKPKDTL
      MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
40     VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL
      PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD
      GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLG

```

En la **SEQ ID NO: 266**, los residuos de aminoácidos 1-119 corresponden al dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1 (**SEQ ID NO: 147**), los residuos de aminoácidos 120-217 corresponden al dominio CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO: 254**), los residuos de aminoácidos 218-229 corresponden a la región bisagra de IgG4 estabilizada que comprende las sustituciones de S228P (subrayadas) (**SEQ ID NO: 13**) y los residuos de aminoácidos 230-445 corresponden al dominio CH2-CH3 de IgG4 (**SEQ ID NO: 4**) pero sin el residuo de lisina C-terminal.

Se construyeron cadenas ligeras de anticuerpos humanizados de longitud completa de la siguiente manera: el extremo C-terminal del dominio VL humanizado se fusionó con el extremo N-terminal de una región kappa de cadena ligera humana (**SEQ ID NO: 8**). La misma cadena ligera está emparejada con las cadenas pesadas de IgG1 (AA) e IgG4 (P).

La secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de un anticuerpo PD-1 humanizado ejemplar (hPD-1 mAb 7 (1.2)) que tiene una región constante kappa es (**SEQ ID NO: 264**):

```

60     EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL
      LIHAASNQGS GVPSRFGSGG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
      TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
65     QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV
      THQGLSSPVT KSFNRGEC

```

En la **SEQ ID NO: 264**, los residuos de aminoácidos 1-111 corresponden al dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL2 (**SEQ ID NO: 153**), y los residuos de aminoácidos 112-218 corresponden a la región constante kappa de la cadena ligera (**SEQ IS NO: 8**).

Los anticuerpos anti-PD-1 que tienen regiones constantes alternativas, por ejemplo, regiones Fc modificadas genéticamente, se generan fácilmente incorporando diferentes regiones constantes y/o introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos. Por ejemplo, cuando se desea un anticuerpo biespecífico, se utilizan dominios CH2-CH3 portadores de botones y agujeros para facilitar la heterodimerización. Los anticuerpos quiméricos anti-PD-1 que comprenden los dominios variables murinos y las regiones constantes humanas se generan como se ha descrito anteriormente.

Se probaron los anticuerpos humanizados (IgG1 (AA) y/o IgG4 (P)) para determinar la actividad de unión y bloqueo como se ha descrito anteriormente. La unión a PD-1 humana (shPD-1 His y shPD-1 hFc) y PD-1 de mono cynomolgus (shPD-L1 hFc) de los anticuerpos humanizados fue comparable a la del anticuerpo murino correspondiente. Además, los anticuerpos humanizados retuvieron la capacidad de bloquear la unión de PD-L1 humana a PD-1 humana en un ensayo ELISA.

La cinética de unión de los anticuerpos murinos PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9, PD-1 mAb 15, los anticuerpos humanizados hPD-1 mAb 2, hPD-1 mAb 7 (1.2), hPD-1 mAb 9 (1.1), hPD-1 mAb 15 y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B se investigaron usando análisis Biacore. Los anticuerpos anti-PD-1 se capturaron en la proteína A inmovilizada y se incubaron con PD-1 humana soluble marcada con His (shPD-1-His) o fusión PD-1 Fc de mono cynomolgus humano soluble (scyno PD-1 hFc) escindida para eliminar la porción Fc, y la cinética de unión se determinó mediante análisis Biacore. En estudios adicionales, los anticuerpos anti-PD-1 hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), y PD-1 mAb B IgG4 (P), se capturaron en Fc antihumano de cabra F(ab)₂ inmovilizado y la cinética de unión se determinaron mediante análisis Biacore como se ha descrito anteriormente. Los k_a , k_d y K_D calculados a partir de estos estudios se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 7						
Captura de proteína A						
Anticuerpo anti-PD-1	humano^a			Mono Cynomolgus^b		
	k_a(x10⁴)	k_d(x10⁻⁴)	KD(nM)	k_a(x10⁴)	k_d(x10⁻⁴)	KD (nM)
PD-1 mAb A	60	18	3	14	9,6	6,9
PD-1 mAb B	140	35	2.5	37	12	3.2
PD-1 mAb 7	21	2.8	1.3	17	6	3,5
hPD-1 mAb 7 (1,2)	110	4.3	0,39	37	6.4	1,7
PD-1 mAb 9	4.3	4.2	9,8	2.2	16	72,7
hPD-1 mAb 9 (1,1)	1.8	6.5	36,1	1,5	11	73,3
PD-1 mAb 15	4.5	1.3	2.9	2,7	11	40,7
hPD-1 mAb 15	2.4	3.2	13,3	2.3	18	78,3
PD-1 mAb 2	5.5	5,6	10,2	4.2	6.0	14.3
hPD-1 mAb 2	3.2	1,6	5,0	2.3	3.9	17
Captura de Fc antihumano de cabra F(ab)₂						
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	13	8.4	6.5	8.1	4.5	5,6
PD-1 mAb A IgG4 (P)	13	7,9	6.1	8.4	5,0	6.0
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	25	28	11,2	20	6.4	3.2
PD-1 mAb B IgG4 (P)	26	25	9,6	20	7,9	4.0
hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG1 (AA)	25	3.8	1,5	16	7.8	4.9
hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	27	4.1	1,5	17	7.8	4.6

(continuación)							
hPD-1 mAb 9 (1,1) IgG1 (AA)	5,6	6.1	10,9		5,6	5.2	9.3
hPD-1 mAb 9 (1,1) IgG4 (P)	6.1	5.8	9.5		4.9	7.4	15,1
^a PD-1 humana soluble marcada con His (shPD-1 His)							
^b PD-1 de mono cynomolgus soluble (scyno PD-1 hFc) escindido							

Los resultados demuestran que PD-1 mAb 7 y el hPD-1 mAb 7 (1.2) humanizado muestran una mejor cinética de unión con respecto a los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B. PD-1 mAb 2, y hPD-1 mAb 2 muestran cinética de unión dentro de aproximadamente el doble de los anticuerpos anti-PD-1 de referencia, mientras que PD-1 mAb 9, hPD-1 mAb 9 (1.1), PD-1 mAb 15 y hPD-1 mAb 15 muestran una cinética de unión dentro de aproximadamente 2-6 veces de los anticuerpos anti-PD-1 de referencia.

Se investigó la especificidad de tejido del anticuerpo anti-PD-1 humana PD-1 mAb 7. Se puso en contacto tejido normal con PD-1 mAb 7 o con un control de isotipo (0,313 µg/ml) y se visualizó la extensión de la tinción. Se usa Bloxall para el bloqueo de enzimas endógenas para reducir la tinción con mucina inespecífica en el tejido del colon. Como se muestra en la **Figura 10A, paneles i-xii**, PD-1 mAb 7 y el control de isotipo fallaron ambos en el marcado de células de tejido normal de colon, hígado, pulmón, páncreas, riñón y corazón. Además, PD-1 mAb 7 y el control de isotipo no lograron teñir la piel normal (**Figura 10B, paneles i-ii**). Por el contrario, se descubrió que PD-1 mAb 7 marcaba fuertemente los linfocitos presentes en el tejido normal de las amígdalas y las células NSO transfectadas con PDCD1 que expresaban PD-1 (**Figura 10B, Paneles iii y v**), mientras que el control de isotipo tampoco pudo marcar (**Figura 10B, Paneles iv y vi**). Los resultados presentados en las **Figuras 10A-10B** por tanto, indican que PD-1 mAb 7 era capaz de unirse específicamente a linfocitos y células que expresan PD-1.

Se examinaron los perfiles de saturación de unión de hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B. Brevemente, cada uno de los anticuerpos anti-PD-1, PD-1 mAb 1-15, o los anticuerpos anti-PD-1 de referencia (PD-1 mAb A y PD-1 mAb B) se mezcló con células NSO que expresan PD-1 humana (~250.000 células/pocillo) en tampón de bloqueo (FACS + albúmina de suero humano al 10%). Para estos estudios, los anticuerpos anti-PD-1 se utilizaron a 50, 12,5, 3,13, 2,0 x 10⁻¹, 4,9 x 10⁻², 1,2 x 10⁻², 3,0 x 10⁻³, 1,9 x 10⁻⁴, 7,6 x 10⁻⁴, 4,75 x 10⁻⁵, o 1,19 x 10⁻⁵ µg/prueba (diluciones en serie de cuatro veces). La cantidad de anticuerpo que se une a la superficie de las células NSO se determinó usando anticuerpo secundario de cabra anti-APC humana mediante análisis FACS. Las curvas de saturación representativas se muestran en la **Figura 11**. Se determinaron los valores de EC50 y EC90 y en la **Tabla 8** se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) de cuatro experimentos separados.

Tabla 8				
Anticuerpo anti-PD-1	Unión de saturación			
	EC50 (µg/prueba)		EC90 (µg/prueba)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.1991	0.1309	1.4528	0.8040
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.1581	0.1161	1.5464	1.7690
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.1347	0.0681	1.3917	0.9573
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.1398	0.0951	1.1619	1.2681
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.4431	0.1997	2.4374	1.2637
hPD-1 mAb 7 (1.1) IgG1 (AA)	0.1069	0.0500	0.9102	0.5476
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	0.1872	0.1553	0.6810	0.3226
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	0.1376	0.0926	0.6609	0.3437
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)	0.3123	0.2291	1.6486	0.9117
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)	0.5128	0.2228	3.0563	0.9437
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.2927	0.1333	2.0640	0.6096

Los estudios de saturación de unión demuestran que las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 tienen un perfil favorable para unirse a PD-1 de la superficie celular. En particular, PD-1 mAb 7 humanizado (hPD-1 mAb 7 (1.1) y hPD-1 mAb 7 (1.2) que tienen una región Fc de IgG1 (AA) o IgG4 (P)) tienen los valores de EC90 más bajos de todos los anticuerpos examinados.

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos anti-PD-1 humanizados hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7 (1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P) y hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), se examinó su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 humana (shPD-L1) y PD-L2 humana (shPD-L2) a PD-1 expresada en la superficie de las células NSO. Estos ensayos se realizaron esencialmente como se ha descrito anteriormente. Las curvas representativas para la

inhibición de la unión de sPD-L1 y sPD-L2 a PD-1 expresada en células NSO se muestran en las **Figuras 12A y 12B**, respectivamente. Se determinaron los valores de IC50 e IC90 y en la **Tabla 9** se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) de tres experimentos separados.

Tabla 9								
	sPD-L1				sPD-L2			
	IC50 ($\mu\text{g/prueba}$)		IC90 ($\mu\text{g/prueba}$)		IC50 ($\mu\text{g/prueba}$)		IC90 ($\mu\text{g/prueba}$)	
Anticuerpo anti-PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.0203	0.0089	0.2985	0.3279	0.0414	0.0124	0.1601	0.066
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.0156	0.0096	0.0776	0.0208	0.0280	0.0070	0.1594	0.1153
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.0148	0.0008	0.1034	0.0100	0.0280	0.0059	0.1190	0.060
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.0143	0.0013	0.0798	0.0239	0.0280	0.0055	0.0924	0.0065
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.0578	0.0124	0.2480	0.050	0.1294	0.0143	0.3813	0.0656
hPD-1 mAb 7 (1.1) IgG1 (AA)	0.0166	0.0032	0.0674	0.0041	0.0283	0.0147	0.0886	0.0166
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	0.0118	0.0027	0.0678	0.0031	0.0212	0.0031	0.0672	0.0043
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	0.0103	0.0023	0.0520	0.0033	0.0213	0.0019	0.0616	0.0063
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)	0.0593	0.0036	0.3238	0.0508	0.4002	0.5000	0.4573	0.1805
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)	0.0460	0.0118	0.2461	0.0513	0.1105	0.0146	0.2914	0.0526
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.0440	0.0092	0.2068	0.035	0.0945	0.0022	0.3093	0.0588

Los estudios de inhibición de la unión de ligandos demuestran que las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 pueden inhibir la unión de **sPD-L1** y sPD-L2 a PD-1 en la superficie celular. En particular, PD-1 mAb 7 humanizado (hPD-1 mAb 7 (1.1) y hPD-1 mAb 7 (1.2)) tienen los valores de IC90 más bajos de todos los anticuerpos examinados.

Ejemplo 3

Bloqueo del punto de control de PD-1/PD-L1 por anticuerpos anti-PD-1 humana humanizados

Se examinó la capacidad de hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1, (AA), hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG1 (AA), hPD-1 mAb 9(1.1) IgG4 (P), hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA), y los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B para antagonizar el eje PD-1/PD-L1 (es decir, bloquear la interacción PD-1/PD-L1 y prevenir la regulación por disminución de las respuestas de células T) en un ensayo indicador de luciferasa Jurkat-luc-NFAT/CHO-PD-L1. Brevemente, las células CHO que expresan PD-L1 (CHO/PD-L1) se sembraron a 40.000/pocillo en 100 μl de medio de cultivo (RPMI + FBS al 10% + 100 $\mu\text{g/ml}$ de Higromicina B + 100 $\mu\text{g/ml}$ de G418) y se incubaron durante la noche. Al día siguiente se retiró el medio y se añadieron células Jurkat MNFAT-luc2/PD-1 (Promega) a 50.000 células/pocillo en 40 μl en tampón de ensayo (RPMI + FBS al 2%), y anticuerpos anti-PD-1 PD-1 mAb 1-15, o anticuerpos anti-PD-1 de referencia (PD-1 mAb A y PD-1 mAb B) (0-25 $\mu\text{g/ml}$; ocho diluciones en serie de 2,5 veces en tampón de ensayo) a cada pocillo y se incubaron durante 6 horas a 37° C seguido de 5-10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 80 μl de sustrato BioGlo (Promega) a cada pocillo y la placa se incubó durante 5-10 minutos adicionales a temperatura ambiente, se midió la luminiscencia en un lector de placas Victor. Las curvas de saturación representativas se muestran en la **Figura 13**. Se determinaron los valores de EC50 y EC90 y en la **Tabla 10** se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) de cuatro experimentos separados.

Tabla 10				
Anticuerpo anti-PD-1	Señalización del informador			
	EC50 ($\mu\text{g/prueba}$)		EC90 ($\mu\text{g/prueba}$)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.2549	0.0480	2.4474	1.2228
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.2049	0.0719	2.5535	1.2139
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	0.2119	0.1781	2.2036	2.0118
PD-1 mAb B IgG4 (P)	0.1142	0.0323	0.9418	0.2863
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.3539	0.0983	3.8975	2.0054
hPD-1 mAb 7 (1.1) IgG1 (AA)	0.1080	0.0386	1.1992	0.5103
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	0.0944	0.0153	0.6452	0.2615
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	0.0965	0.0169	0.6885	0.1858
hPD-1 mAb 9 IgG1 (AA)	0.2835	0.0530	2.9968	0.8866
hPD-1 mAb 9 IgG4 (P)	0.3154	0.0872	5.0940	4.0496
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	0.2585	0.0592	3.3138	1.0532

Los estudios de señalización del informador demuestran que las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 pueden bloquear el eje PD-1/PD-L1 y evitarán regulación por disminución de las respuestas de las células T. En particular, PD-1 mAb 7 humanizado (hPD-1 mAb 7 (1.1) y hPD-1 mAb 7 (1.2) que tienen una región Fc de IgG1 (AA) o IgG4 (P)) tienen los valores de EC50/EC90 más bajos.

Ejemplo 4

Actividad funcional de los anticuerpos anti-PD-1 humana

La enterotoxina de *Staphylococcus aureus* tipo B (SEB) es un superantígeno microbiano capaz de activar una gran proporción de células T (5-30%) en donantes sensibles a SEB. SEB se une a MHC II fuera de la arboleda de unión de péptidos y, por lo tanto, es dependiente de MHC II, pero no está restringido y mediado por TCR. La estimulación SEB de las células T da como resultado la proliferación de células T oligoclonales y la producción de citoquinas (aunque puede observarse una variabilidad del donante y algunos donantes no responderán). En el plazo de 48 horas después de la estimulación con SEB, las PMBC regulan por incremento PD-1 y LAG-3 con una mejora adicional vista el día 5, cultivo postsecundario en placa de 96 pocillos con estimulación con SEB. La regulación por incremento de las proteínas del punto de control inmunológico PD-1 y LAG-3 después de la estimulación con SEB de las PMBC limita la liberación de citoquinas tras la reestimulación. Se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 solos y en combinación con anticuerpos anti-LAG-3 para potenciar la liberación de citoquinas a través de la inhibición del punto de control.

Brevemente, las PMBC se purificaron usando el método de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante a partir de sangre completa obtenida con el consentimiento informado de donantes sanos (Biological Specialty Corporation) y luego las células T se purificaron usando el kit de células T humanas Dynabeads® Untouched (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cultivaron PMBC purificadas en medio RPMI + FBS inactivado por calor al 10% + penicilina/estreptomicina al 1% en matraces a granel T-25 durante 2-3 días solos o con SEB (Sigma-Aldrich) a 0,1 ng/ml (estimulación primaria). Al final de la primera ronda de estimulación con SEB, las PMBC se lavaron dos veces con PBS e inmediatamente se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una concentración de 1-5 x 10⁵ células/pocillo en medio solo, medio con un control o un anticuerpo anti-PD-1, medio con SEB a 0,1 ng/ml (estimulación secundaria) y sin anticuerpo, o medio con SEB y una IgG de control o un anticuerpo anti-PD-1 +/- un anti-LAG-3 mAb, y se cultivó durante 2-3 días adicionales. Al final de la segunda estimulación, se recogieron los sobrenadantes para medir la secreción de citoquinas usando kits de ELISA DuoSet humanos para IFN γ , TNF α , IL-10 e IL-4 (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se examinó la capacidad de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 solos o en combinación con el anticuerpo anti-LAG-3 único LAG-3 mAb 1 para mejorar la liberación de citoquinas. a través de la inhibición del punto de control. Estos estudios también incluyeron uno o más de los siguientes anticuerpos anti-PD-1 de referencia: PD-1 mAb A; PD-1 mAb B; y LAG-3 mAb A, solos o en combinación. La **Figura 14** muestra los perfiles de secreción de IFN γ de PMBC estimuladas con SEB (0,1 ng/ml) de un donante respondedor representativo (D: 38941), tratado con: sin anticuerpo; anticuerpo de control de isotipo; PD-1 mAb 7 y/o LAG-3mAb 7; PD-1 mAb 9 y/o LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 15 y/o LAG-3 mAb 1; PD-1 mAb 2 y/o LAG-3 mAb 1; o los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb B y/o LAG-3 mAb A (los anticuerpos se usaron a 10 μ g/ml).

En estudios adicionales, se examinó la capacidad de las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 (que comprenden una región Fc de IgG1 humana (AA) o de IgG4 humana (P)) así como los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B para mejorar la liberación de citoquinas mediante la inhibición del punto de control. Para estos estudios, los anticuerpos se utilizaron a 0,625, 2,5 y 10 μ g/ml. Las **Figuras 15A-15B** muestra IFN γ (**Figura 15A**) y TNF α (**Figura 15B**), perfiles de secreción de PMBC estimuladas con SEB (0,2 ng/ml) de un donante respondedor representativo (D: 57709), tratado sin anticuerpo o con uno de los siguientes anticuerpos: control de isotipo; hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P); hPD-1 mAb 9 (1,1) IgG1 (AA); hPD-1 mAb 9 (1,1) IgG4 (P); hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA); o los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG4 (P), PD-1 mAb B IgG1 (AA), PD-1 mAb B IgG4 (P). Los pg/mg totales de IFN γ en las muestras tratadas con SEB + Ab se determinaron para las muestras tratadas con los anticuerpos anti-PD-1 a 0,625, 2,5 y 10 μ g/ml y n en la **Tabla 11** se proporciona la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) de 3 donantes diferentes que respondieron (excepto donde se indica). La proporción de IFN γ secretado en la muestra tratada con las versiones humanizadas de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 (que comprende una Región Fc de IgG1 humana (AA) o de IgG4 humana (P)) sobre los anticuerpos anti-PD-1 de referencia PD-1 mAb A y PD-1 mAb B (es decir, anti-PD-1/PD-1 mAb A humanizado y anti-PD-1/PD-1 mAb B) se presenta en la **Tabla 12** y la **Tabla 13**, respectivamente.

Tabla 11						
Secreción de IFN γ (pg/ml)						
$\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-PD1	0.625 $\mu\text{g/ml}$		2.5 $\mu\text{g/ml}$		10 $\mu\text{g/ml}$	
Anticuerpo anti-PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	221.18	110.89	341.13	247.93	347.46	144.72
PD-1 mAb A IgG4 (P)	281.36	132.65	495.15	190.57	399.41	117.56
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	366.69	196.64	387.682	215.51	387.32	282.81
PD-1 mAb B IgG4 (P)	348.40	185.96	433.382	163.23	551.68	125.08
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	302.05	185.71	610.70	209.77	414.63	272.65
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	384.57 $\pm$	323.79 $\pm$	411.40	398.59	370.06	108.12
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)	340.81	207.76	442.598	303.70	655.29	567.91
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)	309.82	130.30	468.62	350.15	424.35	288.95
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	360.00	274.28	373.32	160.25	541.83	444.22
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	275.88	135.23	372.73	53.53	496.70	235.37
Control de IgG	137.14	76.61	100.65	48.67	138.10	120.81
Sin anticuerpo	120.05	73.90	120.05	73.90	109.46	85.18

$\pm$ Resultados de dos donantes que respondieron

Tabla 12						
Proporción de secreción de IFN γ (nuevo mAb A anti-PD-1/PD-1)						
$\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-PD1	0.625 $\mu\text{g/ml}$		2.5 $\mu\text{g/ml}$		10 $\mu\text{g/mL}$	
Anticuerpo anti-PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
PD-1 mAb A IgG4 (P)	1.00	0.00	1.00	0.00	1.00	0.00
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1.77	0.92	1.28	0.36	1.07	0.42
PD-1 mAb B IgG4 (P)	1.23	0.16	0.92	0.27	1.40	0.12
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	1.36	0.37	2.46	1.85	1.17	0.41
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1.20+	0.35 $\pm$	0.79	0.54	0.95	0.22
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)	1.48	0.19	1.46	0.71	1.70	0.84
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)	1.13	0.13	0.91	0.42	1.02	0.46
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1.50	0.39	1.51	1.23	1.48	0.71
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	1.32	0.53	1.48	0.86	1.42	0.12
Control de IgG	0.63	0.2	0.33	0.08	0.39	0.24
Sin anticuerpo	0.54	0.12	0.39	0.14	0.31	0.17

$\pm$ Resultados de dos donantes que respondieron

Tabla 13						
Proporción de secreción de IFN γ (nuevo mAb B anti-PD-1/PD-1)						
$\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo anti-PD1	0.625 $\mu\text{g/ml}$		2.5 $\mu\text{g/ml}$		10 $\mu\text{g/ml}$	
Anticuerpo anti-PD-1	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	0.37	0.37	0.82	0.20	1.06	0.48
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.82	0.12	1.16	0.38	0.72	0.07
PD-1 mAb B IgG1 (AA)	1.0	0.00	1.0	0.00	1.0	0.00
PD-1 mAb B IgG4 (P)	1.0	0.00	1.0	0.00	1.0	0.00
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	0.84	0.22	1.77	0.81	1.11	0.07
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	0.91 $\pm$	0.26 $\pm$	0.83	0.50	0.68	0.17
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)	1.04	0.59	1.12	0.29	1.60	0.42
hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)	0.92	0.09	0.99	0.36	0.75	0.39
hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)	1.01	0.48	1.07	0.57	1.34	0.15
hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)	0.78	0.12	1.10	0.38	1.46	0.53
Control de IgG	0.39	0.08	0.27	0.08	0.34	0.13
Sin anticuerpo	0.34	0.11	0.31	0.03	0.28	0.08

$\pm$ Resultados de dos donantes que respondieron

Los resultados de estos estudios demuestran que los anticuerpos de PD-1 PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 y PD-1 mAb 15 mejoraron drásticamente la producción de IFN γ (**Figuras 14 y 15A**, y **Tablas 11-13**), y TNF α (**Figura 15B**) de PBMC estimuladas con SEB tras la reestimulación. Además, la combinación de anticuerpos anti-PD-1 con anticuerpos anti-LAG-3 dio como resultado una mejora adicional de la liberación de citoquinas (**Figura 14**) de PBMC estimuladas con SEB tras la reestimulación. En particular, la combinación de PD-1 mAb 2, PD-1 mAb 7, PD-1 mAb 9 o PD-1 mAb 15 con el anticuerpo anti-LAG-3 único LAG-3 mAb 1 proporcionó la mayor mejora.

Ejemplo 5

Estudios de unión de moléculas biespecíficas de PD-1 X LAG-3

Se generaron varias moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3, incluyendo diacuerpos que contienen la región Fc que comprenden tres, cuatro y cinco cadenas y un anticuerpo biespecífico. Se generaron cuatro diacuerpos que tienen cuatro cadenas y que comprenden dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K y se les asignó las designaciones "**DART A**", "**DART B**", "**DART C**" y "**DART I**". Se generaron cuatro diacuerpos que tienen cuatro cadenas y que comprenden los dominios CH1/CL y se les asignaron las designaciones "**DART D**", "**DART E**", "**DART J**" y "**DART 1**". Se generaron dos diacuerpos que tienen cinco cadenas y que comprenden los dominios promotores de heterodímeros de espiral E/k y dominios CH1/CL y se les asignaron las designaciones "**DART F**" y "**DART G**". Se generó un diacuerpo que tiene tres cadenas y que comprende dominios promotores de heterodímeros de espiral E/K y se le asignó la designación "**DART H**." Se generó un anticuerpo biespecífico que tiene cuatro cadenas y se le asignó la designación "**BSAB A**". La estructura y las secuencias de aminoácidos de estas moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 se han proporcionado anteriormente y se resumen en la **Tabla 14 a** continuación.

Tabla 14

Nombre	MAbs originales	Fc [†]	Cadenas	SEQ ID NO:	Otros componentes
DART A	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG4 (YTE)	4	267 (X ₁ = A; X ₂ = Y; X ₃ = T; X ₄ = E) y 268	Espirales E/K; ver Figura 3B
DART B	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,3)	IgG4 (YTE)	4	267 (X ₁ = G; X ₂ = Y; X ₃ = T; X ₄ = E) y 268	Espirales E/K; ver Figura 3B
DART C	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,3)	IgG4	4	267 (X ₁ = G; X ₂ = M; X ₃ = S; X ₄ = T) y 268	Espirales E/K; ver Figura 3B
DART D	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG4 (YTE)	4	269 y 270	CL/CH1; ver Figura 3C
DART E	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG4 (YTE)	4	271 y 272	CL/CH1; ver Figura 3C
DART F	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG1 (AA/YTE)	5	273, 274, 275 y 276	Espirales CL/CH1 y E/K; ver Figura 5
DART G	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG1 (AA/YTE)	5	277, 278, 279 y 280	Espirales CL/CH1 y E/K; ver Figura 5
DART H	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG1 (AA)	3	281, 282 y 283	Espirales E/K; Ver Figura 4A

(continuación)

Tabla 14					
Nombre	MAbs originales	Fc [‡]	Cadenas	SEQ ID NO:	Otros componentes
DART I	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 6 (1,1)	IgG4 (YTE)	4	290 y 291	Espirales E/K; ver Figura 3B
DART J	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 6 (1,1)	IgG4 (YTE)	4	292 y 293	CL/CH1; ver Figura 3C
DART 1	PD-1 mAb A LAG-3 mAb A	IgG1 (AA)	4	284 y 285	CL/CH1; ver Figura 3C
BSAB A	hPD-1 mAb 7 (1,2) hLAG-3 mAb 1 (1,4)	IgG1 (AA)	4	286, 287, 288 y 289	mAb con región Fc de ingeniería de carga
‡ Las moléculas que incorporan regiones Fc de IgG4 también incorporan una región bisagra de IgG4 estabilizada.					

Pueden generarse fácilmente moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 adicionales que comprenden sitios de unión al epítipo de PD-1 y/o LAG-3 alternativos incorporando diferentes dominios VH y VL. De manera similar, pueden generarse moléculas que se unen a un antígeno distinto de LAG-3 incorporando VH y VL que tengan la especificidad deseada.

Se examinaron los perfiles de saturación de unión de los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I y DART 1; los anticuerpos anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) y PD-1 mAb A IgG4 (PAG); y los anticuerpos anti-LAG-3: hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG1 (AA) y LAG-3 mAb A IgG1 (AA) esencialmente como se ha descrito anteriormente. Los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 se probaron para determinar la unión de PD-1 y LAG-3, mientras que los anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 solo se probaron para determinar la unión a sus antígenos respectivos. Para estos estudios se utilizaron células NSO que expresan PD-1 o LAG-3. Se utilizaron los diacuerpos y los anticuerpos (170,0-0,013 μ M o 85,0-0,0021 μ M (diluciones en serie de cuatro veces). Se determinaron los valores de EC50 y EC90 y se presentan en las **Tablas 15-16**. Se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) cuando se realizaron 2 o más experimentos separados.

Tabla 15				
Molécula	Unión por saturación de PD-1			
	EC50 (μ M)		EC90 (μ M)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1.9297	0.4324	9.6027	0.4801
DART B	1.7640 §		12.2700 §	
DART D	2.2267	0.4140	10.9313	2.6351
DART E	3.2180	0.5742	23.840	3.2385
DART F	1.4320 §		14.5800 §	
DART G	1.1488	0.6227	3.4220	2.4600
DART H	4.5310 §		22.6600 §	
DART I	1.3232	0.4890	7.8135	4.0821
DART 1	2.1329	1.4850	13.8113	9.0256
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	1.2083	0.8112	3.9340	1.8746
PD-1 mAb A IgG4 (P)	2.3470	1.2362	22.7770	15.0690
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	1.0879	0.3958	7.4153	3.0794
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.6733	0.5464	9.9543	6.6569
§ resultados de un solo experimento				

Tabla 16				
Molécula	Unión por saturación de LAG-3			
	EC50 (μM)		EC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.8402	0.2231	4.4448	2.4770
DART B	1.0750 §		9.8580 §	
DART D	0.8985	0.5326	5.7967	4.7329
DART E	0.9250	0.8075	5.6450	5.6809
DART F	5.0090	0.5770	19.3350	4.7447
DART G	0.9396	0.3045	8.5507	4.7448
DART H	2.3840 §		9.7810	4.2412
DART I	0.5321	0.0547	4.198	3.2188
DART 1	20.0233	2.1454	115.97	15.2425
hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P)	1.0057	0.1969	5.1360	4.7904
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0.5968	0.1376	2.0833	0.3244
hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG1 (AA)	0.6069	0.3430	3.6373	2.4762
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0.4523	0.1660	2.0187	0.7035

§ resultados de un solo experimento

Los estudios de saturación de la unión demuestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 retienen la unión a PD-1 y tienen perfiles de unión que son similares a los perfiles de unión de los anticuerpos anti-PD-1 originales. De manera similar, los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 retienen la unión a LAG-3 y, con la excepción de DART 1, tienen perfiles de unión que son similares a los perfiles de unión de los anticuerpos anti-LAG-3 originales.

Ejemplo 6

Estudios de inhibición de moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3

Se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 y BSAB A; y los anticuerpos anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) y PD-1 mAb A IgG4 (P), para bloquear la unión de PD-L1 humana (shPD-L1) y PD-L2 humana (shPD-L2) a PD-1 expresada en la superficie de las células NSO, esencialmente como se ha descrito anteriormente. Los diacuerpos y anticuerpos se utilizaron a 33,75-0,002 μM o 107,5-0,0001 μM (diluciones en serie de cuatro veces).

Se determinaron los valores de IC50 e IC90 y se presentan en la **Tabla 17**. Se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) cuando se realizaron 2 o más experimentos separados.

Tabla 17								
Molécula	Bloqueo de unión de sPD-L1/PD-1				Bloqueo de unión de sPD-L2/PD-1			
	IC50 (μ M)		IC90 (μ M)		IC50 (μ M)		IC90 (μ M)	
	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.9645	0.1485	5.6312	1.5247	1.6273	0.4285	6.9335	3.9849
DART B	1.1515	0.0007	4.8615	0.2199	2.1150	0.3154	7.9550	0.0933
DART D	1.5548	0.1692	7.8950	2.5135	3.1255	0.5869	9.2973	5.5426
DART E	1.6533	0.3307	7.8470	1.1642	2.9460	0.7736	6.6135	0.0177
DART F	0.5697	0.1729	2.0360	0.1174	0.8389	0.0846	1.7995	0.2171
DART G	1.6013	0.3581	8.1953	1.5708	2.5540	0.7891	7.4810	0.2333
DART H	3.3950	0.1018	18.640	9.5742	6.2065	3.6847	29.395	3.8679
DART I	0.8363	0.1302	5.3115	0.3125	1.286	0.3125	6.2485	1.3951
DART 1	1.7467	0.3097	5.4533	1.0214	2.8355	1.8250	7.2735	3.9831
BSAB A	2.1590	0.3097	11.075	0.8132	4.8775	0.5438	15.580	1.3294
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)	0.5186	0.1668	3.8050	1.2227	1.0425	0.2563	3.4880	0.5459
PD-1 mAb A IgG4 (P)	0.9209	0.3256	4.3023	0.7069	1.3859	0.3882	5.1675	0.2943
hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1(AA)	0.7320	0.2337	3.2048	1.1479	0.9769	0.2893	2.8437	1.4801
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.0765	0.2393	5.2775	0.9933	1.9510	0.8814	5.0880	1.3831

Los estudios de inhibición de la unión de ligandos demuestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 conservan la capacidad de inhibir la unión de sPD-L1 y sPD-L2 a PD-1 en la superficie celular.

Además, se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 y BSAB A; y los anticuerpos anti-LAG-3: hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P), LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG1 (AA) y LAG-3 mAb A IgG1 (AA) para bloquear la unión de LAG-3 humano a MHC clase II nativo en la superficie de las células Daudi. Brevemente, cada molécula biespecífica de PD-1 x LAG-3 y anticuerpo anti-LAG-3 de control se mezcló con una proteína de fusión LAG-3-Fc humana soluble biotinilada (shLAG-3), (a 0,5 µg/ml) y se incubaron por separado con células Daudi positivas para MHC II (2,5 x 10⁶ células). La cantidad de LAG-3 que se une a la superficie de las células Daudi se determinó usando un anticuerpo secundario de estreptavidina conjugado con PE mediante análisis FACS. Los diacuerpos y anticuerpos se utilizaron a 27,5-0,026 µM (diluciones en serie de dos veces) o 107,5-0,0001 µM (diluciones en serie de cuatro veces) o 35-0,002 µM (diluciones en serie de cuatro veces).

Se determinaron los valores de IC₅₀ e IC₉₀ y se presentan en la **Tabla 18**. Se proporcionan la media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) cuando se realizaron 2 o más experimentos separados.

Tabla 18				
Molécula	Bloqueo de unión de shLAG-3/MHC Clase II			
Molécula	EC ₅₀ (µM)	EC ₉₀ (µM)	EC ₅₀ (µM)	EC ₉₀ (µM)
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	1.3835	1.6465	8.396102	8.3962
DART B	0.4081	0.1104	3.0645	0.3924
DART D	1.1843	1.1398	8.0041	7.3317
DART E	3.2706	2.9177	28.9683	24.1694
DART F	1.5347	1.2674	10.3920	11.2555
DART G	2.0618	3.3552	11.4422	12.4964
DART H	2.8967	4.9817	17.2533	21.1420
DART I	0.4864	0.1549	2.339	1.1780
DART 1	15.9610	14.0883	87.1486	109.533
BSAB A	0.7101	0.0571	7.2470	1.0706
hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P)	0.4815	0.2176	3.4837	1.7564
LAG-3 mAb A IgG4 (P)	0.7011	0.1900	2.4232	0.3481
hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG1 (AA)	0.3637	0.1409	9.4422	7.9319
LAG-3 mAb A IgG1 (AA)	0.5923	0.3407	2.1451	1.1139

Los estudios de inhibición de unión al ligando demuestran que los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 conservan la capacidad de inhibir la unión de una proteína de fusión shLAG-3-Fc al MHC de clase II en la superficie celular. Con la excepción de DART 1, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 tienen perfiles de inhibición similares a los de los anticuerpos anti-LAG-3 originales.

Ejemplo 7

Bloqueo del punto de control PD-1/PD-L1 por moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3

Se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H, DART I, DART 1 y BSAB A; y los anticuerpos anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA), PD-1 mAb A IgG1 (AA) y PD-1 mAb A IgG4 (P), para antagonizar el eje PD-1/PD-L1 (es decir, bloquear la interacción PD-1/PD-L1 y prevenir la regulación negativa de las respuestas de las células T) en un ensayo informador de luciferasa Jurkat-luc2-NFAT/CHO-PD-L1 (usando células CHO/PD-L1 y células Jurkat MNFAT-luc2/PD-1) esencialmente como se ha descrito anteriormente. Los diacuerpos y anticuerpos se utilizaron a 100-0,0065 µM (diluciones en serie de cuatro veces) o 100-0,0013 µM (diluciones en serie de cinco veces).

Se determinaron los valores de IC₅₀ e IC₉₀ y se presentan en la **Tabla 19**. La media de la muestra (SM) y la desviación estándar (SD σ) se proporcionan cuando se realizaron 2 o más experimentos separados.

Molécula	Tabla 19			
	Señalización del informador			
	IC50 (μM)		IC90 (μM)	
	SM	SD σ	SM	SD σ
DART A	0.8804	0.1949	7.9115	1.3232
DART B	1.079	0.1535	7.5413	3.1483
DART D	1.4044	0.2584	12.0786	3.6616
DART E	1.4060	0.1222	13.7867	1.4981
DART F	0.3404	0.0103	1.8710	0.481
DART G	0.6914	0.0206	4.2090	0.7331
DART H	36.6167	20.8078	968.300	811.8471
DART I	1.3335	0.3641	12.146	6.8787
DART 1	11.8807	3.4905	1048.2000	1508.9992
BSAB A	9.7825	1.0288	113.3350	22.2951
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	0.6460	0.3035	6.0736	2.5513
PD-1 mAb A IgG4 (P)	1.328	0.7439	16.5138	9.7149
hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG1 (AA)	0.5214	0.1541	4.7592	2.1044
PD-1 mAb A IgG1 (AA)	1.4514	1.0049	35.7382	40.9858

Los estudios de señalización del informador demuestran que la mayoría de los constructos de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 conservan la capacidad de inhibir la unión de sPD-L1 a PD-1 en la superficie celular. Los constructos tetravalentes de diacuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3, DART A, DART B, DART D, DART-E, DART F, DART G y DART I fueron los inhibidores más potentes en este ensayo. Se obtuvieron resultados similares para varios de estos constructos biespecíficos examinados en un ensayo informador de PD-L2.

Ejemplo 8

Actividad funcional de moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3

Se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 para potenciar la liberación de citoquinas mediante la inhibición del punto de control en PBMC estimuladas con SEB tras la reestimulación esencialmente como se ha descrito anteriormente, excepto donde se indica.

En estudios iniciales se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART D, DART E, DART F, DART G, DART H; y los anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), solos o en combinación para potenciar la liberación de citoquinas a través de la inhibición del punto de control. En estos ensayos, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 y los anticuerpos se usaron a una concentración total de 3,125, 12,5 o 50 nM, y las PBMC se estimularon con 0,2 ng/ml de SEB (los estudios anteriores usaron 0,1 ng/ml). Para estos estudios, cuando se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la mitad de la concentración total (es decir, 1,563, 6,25 o 25 nM). Las **Figuras 16A y 16B** muestran los perfiles de secreción de IFN γ de PBMC estimuladas con SEB de dos donantes respondedores representativos, D: 35644 y D: 59697, respectivamente.

Como se ha indicado, no todos los donantes responden a SEB a 0,1 o 0,2 ng/ml. Para mejorar la estimulación con SEB de PBMC de un número más amplio de donantes se usó SEB a una concentración alta de 85 ng/ml, o una concentración media de 0,5 ng/ml en estudios adicionales. A estas concentraciones, la estimulación de SEB es más robusta en más donantes, aunque aún puede observarse la variabilidad de donante a donante.

En uno de tales estudios, se examinó la capacidad de las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B; el anticuerpo anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P); el anticuerpo anti-LAG-3: LAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P); y la combinación de: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), para potenciar la liberación de citoquinas mediante la inhibición del punto de control. En estos ensayos, se usaron moléculas y anticuerpos biespecíficos PD-1 x LAG-3 a una concentración de 0,019, 0,078, 0,3125, 1,25, 5 o 20 nM y las PBMC se estimularon con 85 ng/ml de SEB. Para este ensayo en el que se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporcionó a la concentración indicada y, por lo tanto, la concentración de anticuerpo total es el doble de la concentración usada para cada anticuerpo (es decir, 0,038, 0,156, 0,625, 2,5, 10 o 40 nM). Las **Figuras 17A y 17B** muestran los perfiles de secreción de IFN γ de PBMC estimuladas con SEB de dos donantes representativos, D: 55515 y D: 54024, respectivamente.

En otro estudio se examinaron las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART A, DART B, DART C; el anticuerpo anti-PD-1: hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P); el anticuerpo anti-LAG-3: LAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P); y la

combinación de: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), para potenciar la liberación de citoquinas mediante la inhibición del punto de control. En estos ensayos, se usaron las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 y los anticuerpos a una concentración total de 0,048, 0,195, 0,78, 3,125, 12,5 o 50 nM y las PBMC se estimularon con 0,5 ng/ml de SEB. Para estos estudios, cuando se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la mitad de la concentración total (es decir, 0,024, 0,098, 0,39, 1,563, 6,25 o 25 nM). Las **Figuras 18A y 18B** muestran los perfiles de secreción de IFN γ de PBMC estimuladas con SEB de dos donantes representativos, D: 20990 y D: 54947, respectivamente).

En un estudio adicional, se examinó la liberación de la citoquina IL-2. Específicamente, se examinaron las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART D, DART H; los anticuerpos anti-PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P); los anticuerpos anti-LAG-3: LAG-3 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P); y la combinación de: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), y hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) y LAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P), para mejorar la liberación de IL-2 a través de la inhibición del punto de control. En estos ensayos, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 y los anticuerpos se usaron a una concentración total de 3,125, 12,5 o 50 nM y las PBMC se estimularon con la concentración alta de 85 ng/ml de SEB. Para estos estudios, cuando se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la mitad de la concentración total (es decir, 1,563, 6,25 o 25 nM). La **Figura 19** muestra el perfil de secreción de IL-2 de PBMC estimuladas con SEB de un donante representativo (D: 54024).

En estudios adicionales, se examinaron las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3: DART B y DART I; los anticuerpos anti-PD-1: PD-1 mAb A IgG4 (P) y hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P); los anticuerpos anti-LAG-3: LAG-3 mAb A IgG4 (P), hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P) y hLAG-3 mAb 6 (1.1) IgG4 (P); y las combinaciones de: PD-1 mAb A IgG4 (P) y LAG-3 mAb A IgG4 (P), hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) y hLAG-3 mAb 1 (1.4) IgG4 (P), y hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) y hLAG-3 mAb 6 (1.1) IgG4 (P) para potenciar la liberación de citoquinas a través de la inhibición del punto de control. En estos ensayos, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 y los anticuerpos se usaron a una concentración de 0,0061, 0,024, 0,09, 0,39, 1,56, 6,25 o 25 nM y las PBMC se estimularon con 0,5 ng/ml de SEB. Para estos estudios, donde se usa una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la concentración indicada y por tanto la concentración de anticuerpo total es dos veces la concentración usada para cada anticuerpo, es decir, 0,0122, 0,048, 0,18, 0,78, 3,12, 12,5 o 50 nM). La **Figura 20** muestra los perfiles de secreción de IFN γ de PBMC estimuladas con SEB de un donante representativo D: 56041).

Se examinó la capacidad de la molécula biespecífica PD-1 x LAG-3 DART I; la combinación del anticuerpo anti-PD-1 PD-1 mAb A IgG4 y el anticuerpo anti-LAG-3 LAG-3 mAb A IgG4 (P); y un anticuerpo de control negativo para mejorar las respuestas de células T específicas de antígeno usando un ensayo de recuperación de toxoide tetánico. En particular, se midió la respuesta de la secreción mejorada de citoquinas específica de antígeno usando toxoide tetánico como antígeno de recuperación en el sistema de ensayo de cocultivo. Brevemente, se aislaron células T de memoria CD4 (0,5-1,0 X 10⁵ células/pocillo) usando kits de aislamiento de selección negativa (Miltenyi Biotec, San Diego, CA e Invitrogen, Carlsbad, CA) de sangre periférica humana y se cultivaron durante 5-7 días con monocitos irradiados (0,01-0,05X10⁵ células/pocillo, 3500 rads) del mismo donante en presencia o ausencia de 5 μ g/ml, el antígeno de memoria del toxoide tetánico (TTd) y la dilución (partiendo de 25 nM) de DART I, PD-1 mAb A IgG4 + LAG-3 mAb A IgG4 (P), o un control de isotipo. En placas paralelas, se midió la proliferación mediante la incorporación de timidina titulada e IL-2 y se midió IFN γ usando ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) en los días 5-7. Las **Figuras 21A-D** muestran los perfiles de secreción de IFN γ (**Figura 21A, 21C**) e IL-2 (**Figura 21B, 21D**) en el día 7, de dos donantes representativos (D50702 y D54267).

Los resultados de estos estudios demuestran que las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 mejoraron drásticamente la producción de IFN γ (**Figuras 16A-16B, 17A-17B, 18A-18B, 20**) e IL-2 (**Figura 19**) de PBMC estimuladas con SEB tras la reestimulación. Además, las moléculas biespecíficas PD-1 x LAG-3 mejoraron drásticamente la producción de IFN γ (**Figuras 21A y 21C**) de células T de memoria CD4 estimuladas con toxoide tetánico. En particular, las moléculas biespecíficas tetravalentes PD-1 x LAG-3 proporcionaron una mejora mayor que la combinación de anticuerpos anti-PD-1 con anticuerpos anti-LAG-3.

Ejemplo 9

Farmacocinética de moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3

Se examinó la farmacocinética de una molécula biespecífica de PD-1 x LAG-3 representativa, DART I y un anticuerpo anti-PD-1 representativo, PD-1 mAb A en monos Cynomolgus. Brevemente, se infundieron dos monos cynomolgus (un macho y una hembra) con una dosis única de DART I (5 mg/kg) o PD-1 mAb A (10 mg/kg) y se monitorizó la concentración en suero de las moléculas a lo largo del tiempo usando un ensayo ELISA tipo sándwich. Brevemente, se recubrieron placas de ensayo maxisorb de 96 pocillos con PD-1 humana soluble (shPD-1), se bloquearon con albúmina de suero bovino, se lavaron e incubaron con estándares de calibración, estándares de control de calidad y muestras de suero diluidas. La cantidad de DART I y PD-1 mAb A capturados se evaluó mediante la adición secuencial de una Fc-biotina secundaria de IgG antihumana de cabra y estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP). La actividad de HRP se detectó usando sustrato TMB. Todas las muestras

se analizaron con un lector de microplacas (SpectraMax M2e, Molecular Device, Sunnyvale, CA) y las señales de OD producidas por los calibradores estándar se usaron en el modelo logístico de cuatro parámetros usando el software SoftMax Pro (Versión 5.4, Molecular Devices). Las concentraciones de PD-1 mAb A o DART I se determinaron a partir de la interpolación de los datos de la señal de OD de las muestras con la ecuación que describe la curva estándar. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para este ensayo se estimó en 9,775 ng/mL.

La **Figura 22** muestra la concentración en suero a lo largo del tiempo, las líneas representan la media de monos machos (símbolos rellenos) y hembras (símbolos abiertos) infundidos con DART I (línea continua, triángulos) o PD-1 mAb A (línea discontinua, círculos). Estos datos demuestran que la farmacocinética de una molécula biespecífica de PD-1 x LAG-3 es comparable a la de un anticuerpo anti-PD-1 en monos cynomolgus.

Ejemplo 10

Estudio de toxicología de anticuerpos de PD-1 y moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3

Se evaluó el perfil de seguridad de un anticuerpo anti-PD1 representativo, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), y una molécula biespecífica de PD1 x LAG3 representativa, DART I, en un estudio de dosificación no GLP (buenas prácticas de laboratorio) en monos cynomolgus.

En este estudio se evaluó la toxicidad potencial y la toxicocinética del anticuerpo anti-PD-1 (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)), cuando se administra mediante múltiples infusiones intravenosas. Además, también se evaluó la toxicidad potencial y la farmacocinética de la molécula PD-1 x LAG-3 DART (DART I), cuando se administra mediante una única infusión intravenosa. El diseño del estudio se presenta en la **Tabla 20**.

Tabla 20							
Grupo N°	Material de prueba	Nivel de dosis (mg/kg)	Días de dosificación	Volumen de la dosis	Dosis (mg/ml)	N° de animales	
						Machos	Hembras
1	Control	0	1, 8, 15	5	0	1 ^a	1 ^a
2A	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1 ^a	1 ^a
2B	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	1	1, 8, 15	5	0,2	1 ^b	1 ^b
3A	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 ^a	1 ^a
3B	hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P)	100	1, 8, 15	5	20	1 ^b	1 ^b
4	DART I	5	1	5	1	1 ^c	1 ^c

^a Los grupos 1, 2A y 3A se dosificaron comenzando el día 1 y se les practicó la necropsia 72 horas después de su última (tercera) dosis el día 18.

^b Los grupos 2B y 3B se dosificaron comenzando el día 1 y se les practicó la necropsia 7 días después de su última (tercera) dosis el día 22.

^c El grupo 4 se dosificó comenzando el día 1 y se siguió durante 28 días después de la administración de la única dosis (hasta el día 29); los animales fueron devueltos luego a la colonia.

En este estudio se evaluaron los siguientes parámetros y criterios de valoración: signos clínicos, peso corporal, consumo de alimentos, temperatura corporal, parámetros de patología clínica (hematología, coagulación y química clínica), bioanálisis y parámetros toxicocinéticos, análisis de anticuerpos antifármacos, citometría de flujo, citoquinas, descubrimientos de la necropsia macroscópicos, peso de los órganos y exámenes histopatológicos.

Todos los animales sobrevivieron hasta la eutanasia programada el día 18 o 22 o la liberación del estudio el día 29. Para hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) no hubo cambios relacionados con el artículo de prueba en los signos clínicos, consumo de alimentos, peso corporal, temperatura corporal, hematología, coagulación o parámetros de química clínica, o descubrimientos de necropsia macroscópicos. En los días 18 y 22, fueron evidentes aumentos en el peso del bazo y un infiltrado linfohistiocítico de leve a moderado dependiente de la dosis de la pulpa roja en animales que recibieron hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) a 1 o 100 mg/kg. En comparación con los linfocitos circundantes, las células linfohistiocíticas tenían un citoplasma pálido y núcleos irregulares. Fueron evidentes figuras mitóticas raras. El infiltrado fue una correlación microscópica para el peso del bazo aumentado.

Los perfiles de concentración en suero-tiempo para animales a los que se les administró hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) muestran el perfil esperado para un anticuerpo en esta especie, con unas pocas excepciones. Las pendientes de las curvas después de la tercera dosis cayeron más bruscamente que después de la primera dosis para dos animales en el grupo de dosis de 1 mg/kg y dos animales en el grupo de dosis de 100 mg/kg, lo que indica la posible aparición de anticuerpos antifármacos (ADA) en los ciclos posteriores. El análisis mostró que 2/4 animales

desarrollaron ADA en el grupo de 1 mg/kg y 1/4 animales desarrollaron ADA en el grupo de 100 mg/kg.

En conclusión, la administración de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) por infusión intravenosa una vez a la semana durante 3 semanas (días 1, 8 y 15) fue bien tolerada en monos cynomolgus a niveles de 1 y 100 mg/kg. Un infiltrado celular linfohistiocítico de leve a moderado dependiente de la dosis de la pulpa roja esplénica estaba presente a 1 y 100 mg/kg de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P).

Para DART I, no hubo cambios relacionados con el artículo de prueba en los signos clínicos, el consumo de alimentos, el peso corporal, la temperatura corporal, la hematología o los parámetros de coagulación. Los cambios relacionados con DART I en los parámetros de la química clínica incluyeron elevaciones transitorias no adversas de la aspartato aminotransferasa (AST) y la lactato deshidrogenasa (LDH) el día 2. El cambio medio de AST fue de 3,2x en los animales de control tratados con vehículo y 7,8x en los niveles previos al estudio, con niveles por encima del intervalo de referencia de control 2. El cambio medio de LDH fue de 2,5x los animales de control tratados con vehículo y 6,9x los niveles previos al estudio. Ambos parámetros volvieron a niveles cercanos al valor de referencia el día 8. En conclusión, la administración única de DART-I por infusión intravenosa fue bien tolerada en monos cynomolgus a un nivel de 5 mg/kg.

Ejemplo 11

Estudio PK de dosis única con anticuerpos anti-PD-1

Se realizó un estudio farmacocinético de dosis única con criterios de valoración toxicológicos seleccionados en monos cynomolgus. En este estudio, se comparó hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) con otros dos mAb anti-PD1 IgG4 (P), κ: PD-1 mAb A IgG4 (P) y PD-1 mAb B IgG4 (P). Cada anticuerpo se administró a 10 mg/kg mediante infusión intravenosa de 1 hora a 2 monos (1 M, IF) y los animales se monitorizaron durante 65 días.

No hubo signos clínicos relacionados con el artículo de prueba, cambios en el peso corporal, consumo de alimentos, citoquinas o inmunofenotipificación asociados con la administración de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) o PD-1 mAb A IgG4 (P). Los datos fueron similares para PD-1 mAb B IgG4 (P) con la excepción de que se observaron elevaciones en IL-5 después de la administración de PD-1 mAb B IgG4 (P).

La unión del anticuerpo **anti-PD-1** a PD-1 en la superficie de las células T se determinó mediante citometría de flujo usando un método de competición en el que la intensidad de fluorescencia media (MFI) de unión de hPD-1 mAb 7 (1,2) IgG4 (P) marcado con fluorescencia a células T en ausencia (control de PBS) o presencia de un exceso de competidor hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) no marcado durante el transcurso de tiempo completo de las muestras de sangre recogidas de los monos cynomolgus tratados con 1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), PD-1 mAb A IgG4 (P) o PD-1 mAb B IgG4 (P). Como se muestra en las **Figuras 23A-23C**, hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) y PD-1 mAb B IgG4 (P) demostraron unión prolongada a PD-1 en la superficie de células T CD4+ y CD8+ (unión de PD-1 mantenida a ≥ 80% durante 28 días o más) (**Figuras 23A y 23C**, respectivamente) en comparación con PD-1 mAb A IgG4 (P) (la unión de PD-1 se mantiene en ≥80% durante 21 días o menos) (**Figura 23B**). Para cada uno de los anticuerpos anti-PD-1, los datos de unión de PD-1 de células T se correlacionaron con sus concentraciones en suero.

Ejemplo 12

Estudios de toxicología de dosis repetidas

Para evaluar el perfil de seguridad, toxicocinético y farmacodinámico de las moléculas terapéuticas de la presente divulgación, se administró una molécula ejemplar (hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)) a monos cynomolgus y se realizó un estudio de dosificación GLP (Buenas prácticas de laboratorio). En este estudio, cuatro grupos de animales (10 por grupo, 5 machos y 5 hembras) fueron tratados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) o un artículo de control, una vez a la semana por infusión a 3 niveles de dosis. Se evaluó a los animales para detectar cualquier posible toxicidad durante un período de dosificación del fármaco de 4 semanas seguido de monitorización durante un período adicional de 10 semanas sin fármaco. El diseño experimental de este estudio se presenta en la **Tabla 21**. A los animales se les dosificó una vez a la semana mediante una infusión intravenosa de una hora usando una bomba de infusión calibrada los días de estudio 1, 8, 15 y 22. Un macho y una hembra de cada grupo se sacrificaron el día 25, los animales restantes se sacrificaron en el día 95 del estudio. Se evaluaron los efectos de la administración de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) sobre las subpoblaciones de leucocitos en circulación, incluyendo la ocupación de los receptores PD-1 en los linfocitos T. Además, se determinaron los perfiles de anticuerpos anti-fármaco (ADA).

Tabla 21								
Grupo Nº	Material de prueba ^a	Nivel de dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (ml/kg)	Dosis (mg/ml)	No. de animales ^b			
					Estudio principal		Estudio de recuperación	
					M	F	M	F
1	Control	0	5.88	0	3	3	2	2
2	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	10	5.88	1.7	3	3	2	2
3	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	40	5.88	6.8	3	3	2	2
4	hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P)	150	5.88	25.5	3	3	2	2
^a Se administraron control y hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) semanalmente mediante infusión intravenosa ^b Se practicó la necropsia a seis monos (3M/3F) por grupo el día 25, mientras que a los monos restantes del grupo de recuperación (2M/2F) se les practicó la necropsia el día 95								

Las infusiones intravenosas (IV) una vez a la semana de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) a 0, 10, 40 y 150 mg/kg en monos cynomolgus fueron bien toleradas y todos los animales sobrevivieron a su eutanasia programada en los días 25 o 95. No hubo cambios relacionados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en los signos clínicos, el consumo de alimentos, el peso corporal, los exámenes físicos, oftálmicos y neurológicos, la electrocardiología, la temperatura corporal, la frecuencia respiratoria, la presión arterial y la frecuencia cardíaca, coagulación, química clínica y parámetros del análisis de orina, peso de los órganos o descubrimientos macroscópicos de la necropsia.

Los cambios relacionados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en los parámetros hematológicos incluyeron disminuciones transitorias en los títulos de linfocitos. Los títulos de linfocitos disminuyeron moderadamente en comparación con el estudio previo (día 1 antes de la dosis) el día 2 (23 horas después de la infusión) en machos y hembras a ≥ 10 mg/kg, estadísticamente significativo para machos a 10 y 40 mg/kg y hembras a 40 y 150 mg/kg en comparación con los controles. Los títulos de linfocitos volvieron casi a los niveles previos al estudio el día 8 antes de la dosis, pero disminuyeron levemente para algunos machos y hembras en todos los niveles de dosis (0,47x a 0,68x antes del estudio) el día 9 (23 horas después de la infusión). Los títulos de linfocitos aumentaron antes de la dosificación los días 15 y 22, pero disminuyeron para algunos machos y hembras (0,36x a 0,54x antes del estudio) los días 16 y 23 (23 horas después de la infusión).

Se observó una disminución transitoria, independiente de la dosis, en las poblaciones de células inmunitarias circulantes, incluyendo leucocitos totales, células T, células B y células NK, 23 horas después del final de la infusión en animales tratados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en comparación con el grupo de control. La mayor magnitud de cambio se observó después de la administración de la primera dosis el día 1; se observaron transitoriamente cambios de menor magnitud después de dosis posteriores en los días 8, 15 o 22. Las poblaciones de células inmunitarias generalmente se recuperaron hasta los valores de referencia o cercanos a ellos a las 72 horas después de la EOI ya lo largo de la fase de recuperación. No se observaron cambios en los monocitos circulantes en los animales tratados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en comparación con el grupo de control.

La unión máxima de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) a células PD-1+/CD4+ y PD-1+/CD8+ se observó durante la fase de tratamiento con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) del estudio en todas las dosis probadas (10, 40 o 150 mg/kg). En recuperación, los animales que no desarrollaron respuestas de anticuerpos antifármacos (ADA), las concentraciones en suero de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) se mantuvieron por encima de 29 µg/ml y la unión de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) máxima a células T PD-1+/CD4+ y PD-1+/CD8+ se mantuvo durante todo el período de recuperación de 10 semanas. En estos animales, no hubo evidencia de modulación de PD-1 en las células T. En los animales en recuperación que desarrollaron respuestas de ADA, la frecuencia de células T PD-1+ unidas a MGD012 disminuyó hasta los niveles de referencia. Las disminuciones de la unión de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) máxima en células PD-1+/CD4+ y PD-1+/CD8+ de animales positivos para ADA se produjo generalmente cuando las concentraciones en suero aparentes de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) cayeron por debajo de aproximadamente 25 µg/ml. Sin embargo, no se sabe si esta relación de umbral aparente se aplica a los animales negativos para ADA, ya que la presencia de ADA en animales positivos para ADA puede contribuir a bloquear la unión de los anticuerpos PD-1 a PD-1.

Hubo diferencias mínimas asociadas al sexo en las respuestas farmacocinéticas de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), que fueron lineales en todo el intervalo de dosis evaluado (10 a 150 mg/kg). Para hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) a 10, 40 y 150 mg/kg, la $C_{\text{máx}}$ media combinada de género fue de 240 µg/ml (0,240 mg/ml), 1078 µg/ml (1,08 mg/ml) y 3938 µg/ml (3,94 mg/ml) y la AUC fue de 47310 h•µg/ml (47,3 h•mg/ml), 205723 h•µg/ml (206 h•mg/ml) y 745681 h•µg/ml (746 h•mg/ml), respectivamente. La depuración media por análisis no compartimental (NCA) del primer ciclo de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) antes de la aparición de ADA, fue de 0,21 ml/h/kg, sustancialmente

menor que la tasa de filtración glomerular de monos cynomolgus, como sería de esperar para una proteína de gran peso molecular. El volumen medio de distribución en estado estacionario por NCA del primer ciclo de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) fue de 68 ml/kg, aproximadamente 1,5 veces el volumen sérico, pero menor que el espacio de agua extracelular. Esto sugiere que hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) se extravasa del compartimento vascular al espacio extracelular del tejido, pero que no todo el espacio extracelular era accesible a esta molécula. El valor medio del tiempo de residencia medio (MRT) por NCA del primer ciclo de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) fue 335 horas o aproximadamente 14 días. La aparición de ADA disminuyó las concentraciones de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en los ciclos 2 a 4. Se observaron evidencias de disminución de las concentraciones en suero de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) después de dosis repetidas de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en 7/10, 4/10 y 3/10 animales en los grupos de dosis de 10, 40 y 150 mg/kg, respectivamente. La presencia de ADA contra hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) se confirmó en 4, 2 y 1 de estos animales en los grupos de dosis de 10, 40 y 150 mg/kg, respectivamente; todos los animales en los que no se confirmó ADA estaban en el grupo de necropsia terminal durante el que las concentraciones en suero de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) probablemente interfirieron con la capacidad de detectar ADA. Por consiguiente, en el análisis TK posterior, cuando una concentración mínima era menor que la concentración mínima anterior, se censuraron los datos de este momento en adelante. A partir del modelo de datos de dos compartimentos en todos los ciclos para los 3 grupos de dosis, excluyendo los puntos que se vieron afectados por la ADA, los valores medios para los parámetros de TK primarios para un modelo de 2 compartimentos fueron 0,22 ml/h/kg para la depuración, 38,5 ml/kg para el volumen de distribución inicial (V_i) y 33,8 ml/kg para V_2 , que produjo un volumen de distribución medio en estado estacionario (V_{ss}) de 72,3 ml/kg y un MRT de 329 horas. Estos valores fueron consistentes con los parámetros obtenidos de NCA de la primera dosis. En ausencia de ADA, las simulaciones predicen que con la dosificación semanal, se alcanzaría el estado estacionario en monos cynomolgus después de la quinta dosis y el índice de acumulación sería 2.4.

El día 25, había infiltrados de células mononucleares perivasculares multifocales mínimas relacionadas con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) en la dermis superficial del sitio de inyección intravenosa en machos a ≥ 40 mg/kg y en mujeres a ≥ 10 mg/kg y fueron una reacción esperada a la inyección repetida de una proteína extraña (anticuerpo monoclonal). El día 95, no se observaron cambios microscópicos relacionados con hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P), lo que indica la recuperación del cambio relacionado con el artículo de prueba presente en el día 25.

En resumen, los resultados de este estudio indican que la administración de hPD-1 mAb 7 (1.2) IgG4 (P) por infusión intravenosa una vez a la semana (días 1, 8, 15 y 22) fue clínicamente bien tolerada en monos cynomolgus a niveles de 10, 40 o 150 mg/kg. Los efectos observados se limitaron a disminuciones transitorias de los linfocitos circulantes y cambios mínimos en el sitio de inyección relacionados con la inyección de una proteína extraña. En base a estos resultados, se consideró que el nivel sin efectos adversos observados (NOAEL) era de 150 mg/kg (C_{max} media combinada por género de 3,94 mg/ml y AUC de 746 h•mg/ml).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MacroGenics, Inc.

<120> Moléculas de unión a PD-1-y métodos de uso de las mismas

<130> N412890EP-A

<150> US 62/198,867

<151> 2015-07-30

<150> US 62/239,559

<151> 2015-10-09

<150> US 62/255,140

<151> 2015-11-13

<150> US 62/322,974

<151> 2016-04-15

<160> 298

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(217)
 <223> Dominio CH2-CH3 de IgG1 humana

5

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (217)..(217)
 <223> Xaa es una lisina (K) o está ausente

10

<400> 1

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

20

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

25

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

30

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

35

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

ES 2 898 958 T3

	85	90	95
5	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 100 105 110		
10	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 115 120 125		
15	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 130 135 140		
20	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 145 150 155 160		
25	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 165 170 175		
30	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 180 185 190		
35	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 195 200 205		
40	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa 210 215		
45	<210> 2 <211> 216 <212> PRT <213> Homo sapiens		
50	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(216) <223> Dominio CH2-CH3 de IgG2 humana		
55	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (216)..(216) <223> Xaa es una lisina (K) o está ausente		
55	<400> 2		

ES 2 898 958 T3

	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	
	1				5					10					15		
5	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	
				20					25					30			
10	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	
			35					40					45				
15	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	
		50					55					60					
20	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	
	65					70					75					80	
25	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	
					85					90					95		
30	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	
				100					105					110			
35	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	
			115					120					125				
40	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
		130					135					140					
45	Asp	Ile	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	
	145					150					155					160	
50	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	
					165					170					175		
55	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	
				180					185					190			
60	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	
		195						200					205				
65	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa									
		210					215										

<210> 3
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(217)
 <223> Dominio CH2-CH3 de IgG3 humana

10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (217)..(217)
 <223> Xaa es una lisina (K) o está ausente

<400> 3

ES 2 898 958 T3

	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
	1				5					10					15		
5	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
				20					25					30			
10	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Lys	Trp	Tyr	
			35					40					45				
15	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
		50					55					60					
20	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
	65					70					75					80	
25	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				85						90					95		
30	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	
				100					105					110			
35	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
			115					120					125				
40	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
		130					135					140					
45	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
	145					150					155					160	
50	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
					165					170					175		
55	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	
				180					185					190			
60	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	
			195					200					205				
65	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa								
		210					215										

<210> 4
 <211> 217
 <212> PRT

	<213> Homo sapiens
	<220>
5	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (1)..(217)
	<223> Dominio CH2-CH3 de IgG4 humana
	<220>
10	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (217)..(217)
	<223> Xaa es una lisina (K) o está ausente
	<400> 4

ES 2 898 958 T3

[illegible]

<220>

<223> Dominio CH2-CH3 de IgG1 humana Que tiene Sustituciones L234A/L235A

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (217)..(217)

<223> Xaa es una lisina (K) o está ausente

<400> 5

10	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
	1				5					10					15	
15	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
				20					25					30		
20	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
			35					40					45			
25	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
	50						55					60				
30	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
	65					70					75					80
35	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
					85					90					95	
40	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
				100					105					110		
45	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met
			115					120					125			
50	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
		130					135					140				
55	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
	145					150					155				160	
	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
					165					170					175	

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190

5

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205

10

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Xaa
 210 215

<210> 6
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> "Portador de botones" Dominio CH2-CH3 de IgG1 humana

20

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (217)..(217)
 <223> Xaa es una lisina (K) o está ausente

25

<400> 6

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15

30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30

35

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45

40

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60

45

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80

50

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95

55

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110

60

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125

65

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

ES 2 898 958 T3

	130	135	140	
5	Ser 145	Asp 150	Ile 155	Ala 160
10	Tyr 165	Lys 170	Thr 175	Thr 180
15	Tyr 185	Ser 190	Lys 195	Leu 200
20	Phe 205	Ser 210	Cys 215	Ser 220
25	Lys 225	Ser 230	Leu 235	Ser 240
30	<210> 7 <211> 217 <212> PRT <213> Secuencia artificial			
35	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (217)..(217) <223> Xaa es una lisina (K) o está ausente			
40	<400> 7			
45	Ala 1	Pro 5	Glu 10	Ala 15
50	Val 20	Val 25	Asp 30	Val 35
55	Val 40	Asp 45	Gly 50	Val 55
60	Gln 60	Tyr 65	Asn 70	Ser 75
65	Gln 80	Asp 85	Trp 90	Leu 95

ES 2 898 958 T3

	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
				100					105					110			
5	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
			115					120					125				
10	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
		130					135					140					
15	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
	145					150					155					160	
20	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
					165					170					175		
25	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
				180					185					190			
30	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gln	
		195						200					205				
35	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa								
	210						215										
40	<210> 8																
	<211> 107																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
45	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(107)																
	<223> Dominio CL kappa de IgG humana																
	<400> 8																

ES 2 898 958 T3

	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
	1				5					10					15		
5	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
				20					25					30			
10	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
			35					40					45				
15	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
		50					55					60					
20	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
	65					70					75					80	
25	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
					85					90					95		
30	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
				100					105								
	<210> 9																
	<211> 104																
	<212> PRT																
35	<213> Homo sapiens																
	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(104)																
40	<223> Dominio CL Lambda de IgG humana																
	<400> 9																

ES 2 898 958 T3

	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	
	1				5					10					15		
5	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	
				20					25					30			
10	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	
			35					40					45				
15	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr	
	50						55					60					
20	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His	
	65					70					75					80	
25	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	
					85					90					95		
30	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser									
				100													
	<210> 10																
	<211> 98																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
35	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(98)																
	<223> Dominio CH1 de IgG1 humana																
40	<400> 10																

[illegible]

<223> Región bisagra de IgG4 estabilizada

<400> 13

5 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10

<210> 14

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector 1

15

<400> 14

20 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Conector 2 que contiene cisteína

<400> 15

30

 Gly Gly Cys Gly Gly Gly
 1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Dominio promotor de heterodímeros

<400> 16

40

 Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Dominio promotor de heterodímeros

<400> 17

55

 Val Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

65

<223> Dominio promotor de heterodímeros

<400> 18

5 Ala Glu Pro Lys Ser Cys
 1 5

<210> 19

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Dominio promotor de heterodímeros

<400> 19

20 Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio promotor de heterodímeros

<400> 20

30 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 1 5

<210> 21

35 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Dominio promotor de heterodímeros (Espiral E)

<400> 21

45 Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15

 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 20 25

<210> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Dominio promotor de heterodímeros "Espiral K"

<400> 22

60 Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15

65 Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 20 25

<210> 23
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Dominio promotor de heterodímeros "Espiral E" que contiene cisteína
 <400> 23
 10
 Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
 1 5 10 15
 15
 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 20 25
 <210> 24
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Dominio promotor de heterodímeros "Espiral K" que contiene cisteína
 25
 <400> 24
 Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
 1 5 10 15
 30
 Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
 20 25
 35
 <210> 25
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Streptococcus dysgalactiae
 40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(46)
 <223> Dominio 3 de unión a albúmina de Proteína G de cepa de Streptococcus G148
 45
 <400> 25
 Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
 1 5 10 15
 50
 Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
 20 25 30
 55
 Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
 35 40 45
 60
 <210> 26
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>

<223> Dominio de unión a albúmina desinmunizado variante

<400> 26

5	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly
	1				5					10					15	
10	Val	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	Ala	Glu
				20					25					30		
15	Gly	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Asp	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro		
			35					40					45			

<210> 27

<211> 46

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de unión a albúmina desinmunizado variante

25 <400> 27

	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly
	1				5					10					15	
30	Val	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Ala	Ala	Asn	Asn	Ala	Lys	Thr	Val	Glu
				20					25					30		
35	Gly	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Ala	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro		
			35					40					45			

<210> 28

<211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio de unión a albúmina desinmunizado variante

<400> 28

50	Leu	Ala	Glu	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Asn	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Tyr	Gly
	1				5					10					15	
55	Val	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Ser	Asn	Ala	Lys	Ser	Val	Glu
				20					25					30		
60	Gly	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Ala	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Pro		
			35					40					45			

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> Conector 2 Alternativo

 <400> 29
 5 Gly Gly Gly Ser
 1

 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10

 <220>
 <223> Conector 2 Alternativo
 15

 <400> 30

 Ala Ser Thr Lys Gly
 20 1 5

 <210> 31
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> Conector
 30

 <400> 31

 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 35 1 5 10

 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40

 <220>
 <223> Conector

 <400> 32
 45
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 1 5 10 15

 <210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50

 <220>
 <223> Conector 2 Alternativo
 55

 <400> 33

 Leu Glu Pro Lys Ser Ser
 60 1 5

 <210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
<223> Conector 2 Alternativo

5 <400> 34

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

10 <210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Conector

<400> 35

20 Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 36
<211> 15
25 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector

30 <400> 36

Leu Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

35 <210> 37
<211> 16
<212> PRT
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Conector

45 <400> 37

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

50 <210> 38
<211> 525
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(525)
<223> LAG-3 Humana (Secuencia de Señalización y Proteína Madura)

60 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(28)
<223> Secuencia de Señalización

65 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (29)..(525)

<223> Proteína Madura

5 <400> 38

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1 5 10 15

10

Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
20 25 30

15

Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
35 40 45

20

Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
50 55 60

ES 2 898 958 T3

	His	Gln	Pro	Asp	Ser	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	His	Pro	Leu
	65					70					75					80
5	Ala	Pro	Gly	Pro	His	Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Ser	Trp	Gly	Pro	Arg	Pro
					85					90					95	
10	Arg	Arg	Tyr	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	Leu	Arg	Ser	Gly
				100					105					110		
15	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Pro	Arg	Val	Gln	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Arg	Gln
			115					120					125			
20	Arg	Gly	Asp	Phe	Ser	Leu	Trp	Leu	Arg	Pro	Ala	Arg	Arg	Ala	Asp	Ala
		130					135					140				
25	Gly	Glu	Tyr	Arg	Ala	Ala	Val	His	Leu	Arg	Asp	Arg	Ala	Leu	Ser	Cys
	145					150					155					160
30	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro
					165					170					175	
35	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Trp	Val	Ile	Leu	Asn	Cys	Ser	Phe	Ser
				180					185					190		
40	Arg	Pro	Asp	Arg	Pro	Ala	Ser	Val	His	Trp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Gln
			195					200					205			
45	Gly	Arg	Val	Pro	Val	Arg	Glu	Ser	Pro	His	His	His	Leu	Ala	Glu	Ser
		210					215					220				
50	Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	Gln	Val	Ser	Pro	Met	Asp	Ser	Gly	Pro	Trp	Gly
	225					230					235					240
55	Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Met	Tyr	Asn
					245					250					255	
60	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala
				260					265					270		
65	Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	Pro	Ala	Gly	Val
			275					280					285			
70	Gly	Thr	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly
		290					295					300				
75	Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Leu
	305					310					315					320

	Glu Asp Val Ser Gln Ala Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His	325	330	335
5	Leu Gln Glu Gln Gln Leu Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr	340	345	350
10	Val Thr Pro Lys Ser Phe Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu	355	360	365
15	Cys Glu Val Thr Pro Val Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser	370	375	380
20	Leu Asp Thr Pro Ser Gln Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala	385	390	395
25	Gln Glu Ala Gln Leu Leu Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln	405	410	415
30	Gly Glu Arg Leu Leu Gly Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser	420	425	430
35	Pro Gly Ala Gln Arg Ser Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly	435	440	445
40	His Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu	450	455	460
45	Val Thr Gly Ala Phe Gly Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro	465	470	475
50	Arg Arg Phe Ser Ala Leu Glu Gln Gly Ile His Pro Pro Gln Ala Gln	485	490	495
55	Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro	500	505	510
60	Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Gln Leu	515	520	525
	<210> 39			
	<211> 120			
	<212> PRT			
	<213> Mus musculus			
	<220>			
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC			
	<222> (1)..(120)			

ES 2 898 958 T3

<223> Dominio variable de cadena pesada de LAG-3 mAb A

<400> 39

5	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
	1 5 10 15
10	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
	20 25 30
15	Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
	35 40 45
20	Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
	50 55 60
25	Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
	65 70 75 80
30	Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
	85 90 95
35	Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
	100 105 110
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
	115 120

40 <210> 40
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(107)
 <223> Dominio variable de cadena ligera de LAG-3 mAb A

50 <400> 40

ES 2 898 958 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
15	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	
	65					70					75					80	
25	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Leu	
					85					90					95		
30	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Ile	Lys						
				100					105								
35	<210> 41																
	<211> 120																
	<212> PRT																
	<213> Mus musculus																
40	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(107)																
	<223> Dominio variable de cadena pesada de LAG-3 mAb 1																
	<400> 41																

ES 2 898 958 T3

	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	
	1				5					10					15		
5	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Arg	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Val	Leu	Lys	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	
	50						55					60					
20	Glu	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Ile	Asn	Ile	Leu	Lys	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
35	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115					120									
40	<210> 42 <211> 6 <212> PRT <213> Mus musculus																
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(6) <223> CDRH1 de LAG-3 mAb 1																
50	<400> 42 Arg Asn Tyr Gly Met Asn 1 5																
55	<210> 43 <211> 17 <212> PRT <213> Mus musculus																
60	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(17) <223> CDRH2 de LAG-3 mAb 1 <400> 43																

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Glu
 1 5 10 15

5 Gly

10
 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(11)
 <223> CDRH3 de LAG-3 mAb 1

20
 <400> 44
 Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
 1 5 10

25
 <210> 45
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(112)
 <223> VL Dominio de LAG-3 mAb 1

35
 <400> 45
 Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
 1 5 10 15

40
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

45
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

50
 Pro Glu Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

55
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

60
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95

65
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(16)
 <223> CDRL1 de LAG-3 mAb 1
 10
 <400> 46
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 15
 <210> 47
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL2 de LAG-3 mAb 1
 25
 <400> 47
 Leu Val Ser Glu Leu Asp Ser
 1 5
 30
 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(9)
 <223> CDRL3 de LAG-3 mAb 1
 40
 <400> 48
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
 1 5
 45
 <210> 49
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Dominio VH de hLAG-3 mAb 1 VH1
 55
 <400> 49

ES 2 898 958 T3

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
5	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
				20					25					30		
10	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
15	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe
	50						55					60				
20	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
25	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
30	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
35	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115					120								
40	<210> 50 <211> 120 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
45	<220> <223> Dominio VH de hLAG-3 mAb 1 VH2 <400> 50															

ES 2 898 958 T3

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
5	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	
		50					55					60					
20	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
35	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115					120									
40	<210> 51																
	<211> 112																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
45	<220>																
	<223> Dominio VH de hLAG-3 mAb 1 VL1																
	<400> 51																
50	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
55	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30			
60	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			35					40					45				
65	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					

	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
	65					70					75					80
5	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
					85					90					95	
10	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
15	<210> 52															
	<211> 112															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
20	<220>															
	<223> Dominio VL de hLAG-3 mAb 1 VL2															
	<400> 52															
25	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
	1				5					10					15	
30	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
				20					25					30		
35	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser
			35					40					45			
40	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
		50					55					60				
45	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
	65					70					75					80
50	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
					85					90					95	
55	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
60	<210> 53															
	<211> 112															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
65	<220>															
	<223> Dominio VL de hLAG-3 mAb 1 VL3															
	<400> 53															

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30			
10	Asp	Gly	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	
			35					40					45				
15	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
20	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65					70					75					80	
25	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	
					85					90					95		
30	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110			
	<210> 54																
	<211> 112																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
35	<220>																
	<223> Dominio VL de hLAG-3 mAb 1 VL4																
40	<400> 54																

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
	1				5					10					15	
5	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
				20					25					30		
10	Asp	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro
			35					40					45			
15	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro
		50					55					60				
20	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
	65					70					75					80
25	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly
					85					90					95	
30	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
	<210> 55															
	<211> 16															
	<212> PRT															
35	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
	<223> CDRL1 del Dominio VL de hLAG-3 mAb 1 VL4															
40	<400> 55															
	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn
	1				5					10					15	
45	<210> 56															
	<211> 118															
	<212> PRT															
	<213> Mus musculus															
50	<220>															
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC															
	<222> (1)..(118)															
	<223> Dominio VH de LAG-3 mAb 6															
55	<400> 56															

ES 2 898 958 T3

	Glu	Val	Leu	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
5	Ser	Val	Lys	Ile	Pro	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	
				20					25						30		
10	Asn	Met	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40						45			
15	Gly	Asp	Ile	Asn	Pro	Asp	Asn	Gly	Val	Thr	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
20	Glu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Arg	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	
				100					105					110			
35	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser											
				115													
40	<210> 57 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus																
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(5) <223> CDRH1 de LAG-3 mAb 6																
50	<400> 57 Asp Tyr Asn Met Asp 1 5																
55	<210> 58 <211> 17 <212> PRT <213> Mus musculus																
60	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(17) <223> CDRH2 de LAG-3 mAb 6 <400> 58																

Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
 1 5 10 15
 5 Gly
 <210> 59
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (1)..(9)
 <223> CDRH3 de LAG-3 mAb 6
 <400> 59
 20 Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr
 1 5
 <210> 60
 25 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(107)
 <223> Dominio VL de LAG-3 mAb 6
 <400> 60
 35 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Arg Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 40 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val
 20 25 30
 45 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 50 Phe Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 60 Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 65 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(11)
 <223> CDRL1 de LAG-3 mAb 6
 10
 <400> 61
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Val Val Ala
 1 5 10
 15
 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL2 de LAG-3 mAb 6
 25
 <400> 62
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5
 30
 <210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL3 de LAG-3 mAb 6
 40
 <400> 63
 His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5
 45
 <210> 64
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(113)
 <223> Dominio variable de cadena pesada de PD-1 mAb A
 55
 <400> 64

ES 2 898 958 T3

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Asp	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe	Ser	Asn	Ser	
				20					25					30			
10	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	
				100					105					110			
	Ser																
35	<210> 65																
	<211> 107																
	<212> PRT																
	<213> Homo sapiens																
40	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(107)																
	<223> Dominio variable de cadena ligera de PD-1 mAb A																
45	<400> 65																

ES 2 898 958 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
15	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	
	65					70					75					80	
25	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Ser	Asn	Trp	Pro	Arg	
					85					90					95		
30	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
				100					105								
	<210> 66																
	<211> 120																
	<212> PRT																
35	<213> Homo sapiens																
	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(120)																
40	<223> Dominio variable de cadena pesada de PD-1 mAb B																
	<400> 66																
45	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
50	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
				20					25					30			
55	Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				

ES 2 898 958 T3

	Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe	
	50						55					60					
5	Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr	
	65					70				75						80	
10	Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
15	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
20	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115					120									
	<210> 67																
	<211> 111																
	<212> PRT																
25	<213> Homo sapiens																
	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(111)																
30	<223> Dominio variable de cadena ligera de PD-1 mAb B																
	<400> 67																
35	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
40	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Lys	Gly	Val	Ser	Thr	Ser	
				20					25					30			
45	Gly	Tyr	Ser	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	
			35					40					45				
50	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	
	50						55					60					
55	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70				75						80	
60	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Ser	Arg	
					85					90					95		
65	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
				100					105					110			
	<210> 68																

	<211> 288
	<212> PRT
	<213> Homo sapiens
5	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (1)..(288)
	<223> Polipéptido de PD-1 Humana (Secuencia NCI NP 005009.2)
10	<220>
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC
	<222> (1)..(20)
	<223> Secuencia Señal de PD-1 Humana
15	<400> 68

ES 2 898 958 T3

	Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro	Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln	
	1				5					10					15		
5	Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp	
				20					25					30			
10	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	
			35					40					45				
15	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	
		50					55					60					
20	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	
	65					70					75					80	
25	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg	
					85					90					95		
30	Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	
				100					105					110			
35	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	
			115					120					125				
40	Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val	
		130					135					140					
45	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	
	145					150					155					160	
50	Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly	
					165					170					175		
50	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys	

ES 2 898 958 T3

	180	185	190
5	Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro 195 200 205		
10	Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly 210 215 220		
15	Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro 225 230 235 240		
20	Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly 245 250 255		
25	Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg 260 265 270		
30	Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu 275 280 285		
35	<210> 69 <211> 121 <212> PRT <213> Mus musculus		
40	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(121) <223> Dominio VH de PD-1 mAb 1		
45	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Arg Val Lys Pro Ser Gln 1 5 10 15		
50	Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Phe Ser Ile Thr Asn Asp 20 25 30		
55	Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp 35 40 45		
60	Met Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu 50 55 60		
65	Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe 65 70 75 80		
70	Leu Gln Leu Ser Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys 85 90 95		

	Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly	
	100	105 110
5	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	115 120
10	<210> 70 <211> 373 <212> ADN <213> Mus musculus	
15	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(373) <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 1	
20	<400> 70	
	cagatccagt gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc cgggtgaaac cttctcagtc	60
25	tctgtccctc acctgcactg tcaactggctt ctcaatcacc aatgattatg cctggaactg	120
	gatccgacag tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc cacataacct acagtggcag	180
	cactagctac aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgggaca catccaagaa	240
30	ccacttcttc ctgcagttga gttctgtgac tcctgaggac acagccacat attactgtgc	300
	aagagattac ggtagtggct acccctatac tttggactac tgggggtcaag gtacctcagt	360
35	caccgtctcc tcc	373
40	<210> 71 <211> 6 <212> PRT <213> Mus musculus	
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(6) <400> 71	
	Asn Asp Tyr Ala Trp Asn	
50	1 5	
	<210> 72 <211> 16 <212> PRT <213> Mus musculus	
55	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(16) <223> CDRH2 de PD-1 mAb 1	
60	<400> 72	
	His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser	
65	1 5 10 15	

<210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(12)
 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 1
 10
 <400> 73
 Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr
 1 5 10
 15
 <210> 74
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(106)
 <223> Dominio VL de PD-1 mAb 1
 25
 <400> 74
 Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 30
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val
 20 25 30
 35
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Gln Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
 40
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 45
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 50
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
 85 90 95
 55
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 60
 <210> 75
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 65

<222> (1)..(318)

<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 1

<400> 75

```

5   caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      60
    atgacctgca gtgccacctc aattgtaagt tacgtttact ggtaccagca gaagcctgga      120
10  tcctccccc aaccctggat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgctcgc      180
    ttcagtggca gtgggtctgg gacctottac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa      240
15  gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtgataacc cgtacacggt cggagggggg      300
    accaagctgg aaataaaa      318

```

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(10)

<223> CDRL1 de PD-1 mAb 1

<400> 76

```

30
    Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val Tyr
    1           5           10

```

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(7)

<223> CDRL2 de PD-1 mAb 1

<400> 77

```

45
    Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
    1           5

```

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 de PD-1 mAb 1

<400> 78

```

60
    Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
    1           5

```

<210> 79

<211> 121

ES 2 898 958 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio VH de hPD-1 mAb 1 VH1

<400> 79

10	Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
	1 5 10 15
15	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Ile Ser Asn Asp
	20 25 30
20	Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
	35 40 45
25	Ile Gly His Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
	50 55 60
30	Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Val
	65 70 75 80
35	Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
	85 90 95
40	Ala Arg Asp Tyr Gly Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr Leu Asp Tyr Trp Gly
	100 105 110
45	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
	115 120

<210> 80

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido Que codifica el hPD-1 mAb 1 VH1

<400> 80

ES 2 898 958 T3

gaggtacagc tccaggaaag tggcccaggt ctggtgaagc catcccagac actgagcctg 60
 acttgcaccg tgagtggctt ctccatctca aatgactacg cctggaattg gattaggcag 120
 5 cctcccggta aagggctgga gtggatcggc cacatcacat acagcggctc cacatcatat 180
 aatcccagtc tgaagagccg tcttaccatt actcgcgaca ctagtaagaa ccagtttggt 240
 10 ctgaccatga ccaacatgga ccctgtggat actgcaacat actattgtgc tcgagattat 300
 gggttctggtt acccttatac actcgactac tggggacagg gaaccactgt gaccgtgagc 360
 tcc 363
 15
 <210> 81
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Dominio VL de hPD-1 mAb 1 VL1
 <400> 81
 25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 30 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ile Val Ser Tyr Val
 20 25 30
 35 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gln Pro Leu Ile Tyr
 35 40 45
 40 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 45 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 50 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asp Asn Pro Tyr Thr
 85 90 95
 55 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 60
 <210> 82
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 1 VL1
 <400> 82

ES 2 898 958 T3

	gaaatcgttc tgaccagag cccagcaacc ctgtctgtct cccccggaga aaaggtcacc	60
	attacttgct ctgctacttc tategtgtcc tacgtgtact ggtatcagca gaagcccggg	120
5	caggctcccc agccattgat atatctgacc agcaacctgg cttctgggat cccagctcgt	180
	ttttccggta gcgggtccgg gactgatttc actttgacta tcagctctct ggaggcagaa	240
10	gacgccgcca cctattattg tcaacagtgg tcagacaatc catacacttt tggcgggtggc	300
	accaaagtcg aaataaag	318
15	<210> 83 <211> 116 <212> PRT <213> Mus musculus	
20	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(116) <223> Dominio VH de PD-1 mAb 2	
25	<400> 83	
	Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15	
30	Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe 20 25 30	
35	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45	
40	Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val 50 55 60	
45	Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe 65 70 75 80	
50	Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys 85 90 95	
55	Ala Ser Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu 100 105 110	
60	Thr Val Ser Ser 115	
65	<210> 84 <211> 348 <212> ADN <213> Mus musculus	

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(348)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 2
 5
 <400> 84
 gatgtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60
 10 tcctgtgcag cctctggatt cgttttcagt agctttggaa tgacttgggt tcgtcaggct 120
 ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat atcagtagtg gcagtatgag catttcctat 180
 15 gcagacacag tgaagggccg attcacgctc accagagaca atgccaagaa caccctgttc 240
 ctgcaaataa ccagtctaag gtctgaggac acggccattt attactgtgc atccctgagt 300
 gactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcc 348
 20
 <210> 85
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(5)
 <223> CDRH1 de PD-1 mAb 2
 30
 <400> 85
 Ser Phe Gly Met His
 35 1 5
 <210> 86
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(17)
 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 2
 45
 <400> 86
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 50 1 5 10 15
 Gly
 55
 <210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 2
 65
 <400> 87

Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

5 <210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(112)
<223> Dominio VL de PD-1 mAb 2

15 <400> 88

Asp Val Val Met Ser Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

20 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

25 Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

30 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

35 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

40 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Phe Phe Cys Ser Gln Thr
85 90 95

45 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

50 <210> 89
<211> 336
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(336)
<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 2

55 <400> 89

gatgttgtga tgtcccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttggt cacagtactg gaaacaccta tttacattgg 120
5 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acagggtttc taaccgattt 180
tctgggggtcc cgcacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
10 agtagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaactac acatgttccg 300
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 90
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 de PD-1 mAb 2

<400> 90
25 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 91
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
35 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 de PD-1 mAb 2

<400> 91
40 Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 92
45 <211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
50 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 de PD-1 mAb 2

<400> 92
55 Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 93
60 <211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Dominio VH de hPD-1 mAb 2 VH1

<400> 93

5	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	1 5 10 15
10	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Val Phe Ser Ser Phe	20 25 30
15	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35 40 45
20	Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val	50 55 60
25	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr	65 70 75 80
30	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys	85 90 95
35	Ala Ser Leu Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	100 105 110
40	Thr Val Ser Ser	115

<210> 94

<211> 348

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 2 VH1

<400> 94

50	gaagtgcaat tggttgagag tgggtggtggc ctggtgcagc caggtggaag tctgcggttg	60
55	tcctgtgcag caagcggatt tgtgttcagc tcttttggga tgcattgggt gcgccaggct	120
60	cccggcaagg gtctcgagtg ggtagcatac atctccagcg ggtccatgtc tattagttat	180
65	gccgacacag tgaaaggcag gtttactatc tcccgtgaca atgcaaaaaa cacactgtac	240
70	ctgcaaatga atagcctgcg caccgaggac accgccttgt actactgcgc ttccctgtct	300
75	gattacttcg actactgggg tcagggcaca actgtgacag tttcttcc	348

<210> 95

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio VL de hPD-1 mAb 2 VL1

5 <400> 95

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

10 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

15 Thr Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

20 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

25 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

30 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Thr
85 90 95

35 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 96

<211> 336

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 2 VL1

45 <400> 96

gacgttgtga tgacacagtc accactgagt ctgccagtta ccctggggcca gccagccagt 60

50 atttcttgtc ggagttcaca gagtctggta cattccacag gaaatacata tctccattgg 120

tacctgcaaa aaccagggca gagccccag ctgctgattt atagagtgtc taatcgattt 180

55 tctggcgtgc cagatcggtt cagcggcagc gggctctggca ctgatttcac actgaaaatc 240

tctaggggtgg aggcagagga cgtaggcgtt tactactgta gtcagaccac ccatgtaccc 300

tggacttttg gccaaaggtag taagctggaa atcaag 336

60 <210> 97

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

65

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(125)
 <223> Dominio VH de PD-1 mAb 3
 5
 <400> 97
 10
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 15
 Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 20
 Val Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 25
 Gly Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 30
 Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 35
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Phe
 85 90 95
 40
 Thr Arg Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe
 100 105 110
 45
 Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 50
 <210> 98
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 55
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(375)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 3
 <400> 98
 60
 cagggttcaac tgcaacagtc tggggctgag ctggtgagggc ctggggcttc agtgacgctg 60
 tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgtaa tgcaactgggt gaagcagaca 120

ES 2 898 958 T3

```

cctgtgcatg gcctggaatg gattggaact attgatcctg aaactggtgg tactgcctac      180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca agtcctccaa cacagcctac      240
5  atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactttac aagagagaag      300
attactacga tagtagaggg gacatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg      360
10 gtcaccgtct cctca                                          375

<210> 99
<211> 5
<212> PRT
15 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(5)
20 <223> CDRH1 de PD-1 mAb 3

<400> 99

                Asp Tyr Val Met His
25                1                5

<210> 100
<211> 17
<212> PRT
30 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(17)
35 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 3

<400> 100

    Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
40    1                5                10                15

    Gly

45

<210> 101
<211> 16
<212> PRT
50 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(16)
55 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 3

<400> 101

    Glu Lys Ile Thr Thr Ile Val Glu Gly Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
60    1                5                10                15

<210> 102
<211> 112
65 <212> PRT

```

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(112)

<223> Dominio VL de PD-1 mAb 3

<400> 102

10 Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

15 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30

20 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

25 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

30 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

35 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

40 Ser His Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 103

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(336)

<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 3

<400> 103

gatgtttttgc tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gagacaccta tttggaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt gggtcaggga cagattttac actcaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatcttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 104

<211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(16)
 <223> CDRL1 de PD-1 mAb 3

10

<400> 104

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

15

<210> 105
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL2 de PD-1 mAb 3

25

<400> 105

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

30

<210> 106
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(9)
 <223> CDRL3 de PD-1 mAb 3

40

<400> 106

Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Tyr Thr
 1 5

45

<210> 107
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(116)
 <223> Dominio VH de PD-1 mAb 4

55

<400> 107

ES 2 898 958 T3

	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Val	Phe	Ser	Ser	Phe	
				20					25					30			
10	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Met	Ser	Ile	Ser	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Thr	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Ser	Leu	Thr	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	
				100					105					110			
35	Thr	Val	Ser	Ser													
				115													
40	<210> 108 <211> 348 <212> ADN <213> Mus musculus																
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(348) <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 4																
	<400> 108																
	gatgtgcagc	tcgtggagtc	tgggggaggc	ttagtgcagc	ctggaggggc	ccggaaactc											60
50	tcctgtgcag	cctctggatt	cgttttcagt	agctttggaa	tgactggggt	tcgtcaggct											120
	ccagagaagg	ggctggagtg	ggtcgcatat	attagtagtg	gcagtatgag	tatttcctat											180
55	gcagacacag	tgaagggccg	attcacccgc	accagagaca	atgccaagaa	caccctgttc											240
	ctgcaaatga	ccagtctaag	gtctgaggac	acggccattt	attactgtgc	atccctgact											300
60	gactactttg	actactgggg	ccaaggcacc	actctcacag	tctcctca												348
65	<210> 109 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus																

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(5)
 <223> CDRH1 de PD-1 mAb 4
 <400> 109

 10 Ser Phe Gly Met His
 1 5
 <210> 110
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(17)
 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 4
 20
 <400> 110
 Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Met Ser Ile Ser Tyr Ala Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 25
 Gly
 30
 <210> 111
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 4
 40
 <400> 111
 Leu Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5
 45
 <210> 112
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 50
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(112)
 <223> Dominio VL de PD-1 mAb 4
 55
 <400> 112

ES 2 898 958 T3

	Asp	Val	Val	Met	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly	
	1				5					10					15		
5	Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	
				20					25					30			
10	Thr	Gly	Asn	Thr	Tyr	Phe	His	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	
			35					40					45				
15	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
20	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65					70				75						80	
25	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Thr	
					85					90					95		
30	Thr	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110			
	<210> 113 <211> 336 <212> ADN <213> Mus musculus																
35	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(336) <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb																
40	<400> 113																
	gatgtt	gtga	tgtcccaa	ac	tccact	ctcc	ctgcct	gtca	gtctt	ggaga	tcaagc	ctcc					60
45	atctc	ctgca	gatctag	tca	gagcct	tgtt	cacagt	actg	gaaacac	cta	tttccatt	gg					120
	tacctg	caga	agccagg	cca	gtctccaa	ag	ctcctgat	ct	acaggg	tttc	taaccgatt	t					180
50	tctggg	gtcc	ccgacag	gtt	cagtggc	agt	ggatcagg	ga	cagatttc	ac	actcaag	atc					240
	agcagag	tgg	aggctgag	ga	tctgggag	t	tatttctg	ct	ctcaaact	ac	acatgtt	ccg					300
	tggacg	ttcg	gtggagg	cac	caagctg	gaa	atcaaa										336
55	<210> 114 <211> 16 <212> PRT <213> Mus musculus																
60	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(16) <223> CDRL1 de PD-1 mAb 4																
65																	

<400> 114

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Thr Gly Asn Thr Tyr Phe His
 1 5 10 15

5

<210> 115
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL2 de PD-1 mAb 4

15

<400> 115

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

20

<210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(9)
 <223> CDRL3 de PD-1 mAb 4

30

<400> 116

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Trp Thr
 1 5

35

<210> 117
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(119)
 <223> Dominio VH de PD-1 mAb 5

45

<400> 117

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Val Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

50

ES 2 898 958 T3

	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ala	Tyr	
				20					25					30			
5	Trp	Met	Asn	Trp	Met	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
10	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asn	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
15	Lys	Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
20	Met	Gln	Leu	Ile	Ser	Pro	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
25	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
30	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala										
			115														
	<210> 118																
	<211> 357																
	<212> ADN																
	<213> Mus musculus																
35	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(357)																
	<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 5																
40	<400> 118																
	caggtccaac	tgcagcagcc	tggggttgaa	ctggtgaggc	ctggagcttc	agtgaagctg											60
45	tcctgcaagg	cttctggcta	ctccttcacc	gcctactgga	tgaactggat	gaaacagagg											120
	cctggacaag	gccttgagtg	gattggcgctg	attcatcctt	ccgatagtga	aacttggtta											180
50	aatcagaagt	tcaaggacaa	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac											240
	atgcaactca	tcagcccgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aagagagcac											300
	tacggtagta	gcccgtttgc	ttactggggc	caagggactc	tggtcactgt	ctctgca											357
55	<210> 119																
	<211> 5																
	<212> PRT																
	<213> Mus musculus																
60	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(5)																
	<223> CDRH1 de PD-1 mAb 5																
65																	

```

<400> 119

                                Ala Tyr Trp Met Asn
                                1           5

5
<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

10
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(17)
<223> CDRH2 de PD-1 mAb 5

15
<400> 120

    Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asn Gln Lys Phe Lys
    1           5           10           15

20

    Asp

25
<210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

30
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(10)
<223> CDRH3 de PD-1 mAb 5

35
<400> 121

                                Glu His Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Ala Tyr
                                1           5           10

40
<210> 122
<211> 111
<212> PRT
<213> Mus musculus

45
<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1) .. (111)
<223> Dominio VL de PD-1 mAb 5

50
<400> 122

    Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
    1           5           10           15

55

```

ES 2 898 958 T3

	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
				20					25					30			
5	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			35					40					45				
10	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	
		50					55					60					
15	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His	
	65					70					75					80	
20	Pro	Met	Glu	Glu	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		
25	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
				100					105					110			
	<210> 123																
	<211> 333																
	<212> ADN																
30	<213> Mus musculus																
	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(333)																
35	<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 5																
	<400> 123																
40	gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc																60
	atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactgggtc																120
	caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc																180
45	ggggtccttg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag atttcagcct caacatccat																240
	cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac																300
50	acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa																333
	<210> 124																
	<211> 15																
	<212> PRT																
55	<213> Mus musculus																
	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(15)																
60	<223> CDRL1 de PD-1 mAb 5																
	<400> 124																

Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn
 1 5 10 15
 5 <210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL2 de PD-1 mAb 5
 15 <400> 125
 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5
 20 <210> 126
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(9)
 <223> CDRL3 de PD-1 mAb 5
 30 <400> 126
 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
 1 5
 35 <210> 127
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(118)
 <223> Dominio VH de PD-1 mAb 6
 45 <400> 127
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Asn Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 50 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 55 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 60 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 65

ES 2 898 958 T3

	50	55	60
5	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr 65 70 75 80		
10	Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys 85 90 95		
15	Ala Arg Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110		
20	Leu Val Thr Val Ser Thr 115		
25	<210> 128 <211> 333 <212> ADN <213> Mus musculus		
30	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(333) <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 6 <400> 128		
35	gaaatcgtac tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60 ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120 cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180 ggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240 tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatcctaaaga ggtgccctat 300 acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333		
50	<210> 129 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus <220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(5) <223> CDRH1 de PD-1 mAb 6 <400> 129		
60	Ser Tyr Gly Met Ser 1 5		
65	<210> 130 <211> 17 <212> PRT		

<213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(17)
 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 6

<400> 130

10 Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asp Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

15 Gly

<210> 131
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(9)
 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 6

25 <400> 131

30 Gln Lys Ala Thr Thr Trp Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 132
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1) .. (111)
 <223> Dominio VL de PD-1 mAb 6

40 <400> 132

45 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

50 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

55 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

60 Lys Leu Leu Ile Tyr Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 133
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(333)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 6

<400> 133

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gaactgggtc 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ctgcatccaa ccaaggatcc 180
ggggtccttg ccaggtttag tggcagtggtg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtgg 300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa 333

<210> 134
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(15)
 <223> CDRL1 de PD-1 mAb 6

<400> 134

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 135
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL2 de PD-1 mAb 6

<400> 135

Pro Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

5 <210> 136
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 de PD-1 mAb 6

15 <400> 136

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
1 5

20 <210> 137
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

25 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(119)
<223> Dominio VH de PD-1 mAb 7

30 <400> 137

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

35 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

40 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

45 Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

50 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

55 Met Gln Leu Ile Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

60 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

65 <210> 138

<211> 357
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(357)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 7

10 <400> 138

gaggtccaac	tgcagcagcc	tggggctgaa	ctggtgaggc	ctggagcttc	agtgaagctg	60
tcctgcaagg	cttctggcta	ctccttcacc	agctactgga	tgaactgggt	gaagcagagg	120
cctggacaag	gccttgagtg	gattggcgtg	attcatcctt	ccgatagtga	aacttggtta	180
gatcagaagt	tcaaggacaa	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccac	cacagcctac	240
atgcaactca	tcagcccgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtgc	aagggagcac	300
tacgggtacta	gcccgtttgc	ttactggggc	caagggactc	tggtcactgt	gtcttcc	357

25 <210> 139
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(5)
 <223> CDRH1 de PD-1 mAb 7

35 <400> 139

	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn
	1				5

40 <210> 140
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(17)
 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 7

50 <400> 140

Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

55

Asp

60 <210> 141
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

65 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(10)

<223> CDRH3 de PD-1 mAb 7

<400> 141

5

Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

10

<210> 142

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1) .. (111)

<223> Dominio VL de PD-1 mAb 7

20

<400> 142

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

25

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

35

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

40

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
65 70 75 80

45

Pro Met Glu Glu Asp Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

50

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 143

<211> 333

<212> ADN

<213> Mus musculus

55

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(333)

<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 7

60

<400> 143

65

gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca gagccaacga aagtgttgat aattatggca tgagttttat gaactggttc 120
5 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatccatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180
ggggtccttg ccaggttttag tggcagtggg tttgggacag acttcagcct caacatccat 240
10 cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 144
<211> 15
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(15)
<223> CDRL1 de PD-1 mAb 7

<400> 144

25 Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Met Ser Phe Met Asn
1 5 10 15

<210> 145
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
35 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 de PD-1 mAb 7

<400> 145

40 Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
1 5

<210> 146
45 <211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
50 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 de PD-1 mAb 7

<400> 146

55 Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 147
60 <211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH1

<400> 147

5	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	1 5 10 15
10	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr	20 25 30
15	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	35 40 45
20	Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe	50 55 60
25	Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	65 70 75 80
30	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95
35	Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	100 105 110
40	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115

<210> 148

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 7 VH1

<400> 148

50	caagttcaat tgggtacagag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg	60
50	tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca	120
55	ccagggcagg gtctggaatg gattgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg	180
55	gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtccacaag cactgcttac	240
60	atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac	300
60	tacggcacat caccttttgc atactggggc caggggaactc tcgtaaccgt atcctcc	357

<210> 149

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio VH de hPD-1 mAb 7 VH2

<400> 149

5 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

10 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

15 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ala
35 40 45

20 Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
50 55 60

25 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

30 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35 Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 150

<211> 357

<212> **ADN**

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 7 VH2

<400> 150

50 caagttcaat tggtagacag cggggcagag gtgaagaaac ccggcgccag tgttaaggtg 60

tcctgcaaag ccagcgggta cagctttaca agctattgga tgaattgggt gcgtcaagca 120

55 ccagggcagg gtctggaatg ggctgggggtg atacatcctt ctgacagcga aacatgggtg 180

gaccagaaat ttaaagatcg tgtgacaatt acagtcgata agtcacacaag cactgcttac 240

60 atggaactct ccagcttgcg gtccgaggac accgctgtgt attattgcgc cagagagcac 300

tacggcacat caccttttgc atactggggc cagggaaactc tcgtaaccgt atcctcc 357

<210> 151

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL1

<400> 151

10	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
	1 5 10 15	
15	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Asn Glu Ser Val Asp Asn Tyr	
	20 25 30	
20	Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
	35 40 45	
25	Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser	
	50 55 60	
30	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	
	65 70 75 80	
35	Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys	
	85 90 95	
40	Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	100 105 110	

<210> 152

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 7 VL1

<400> 152

50	gaaatcgtagc tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact	60
	ctcagctgca gagcaaatga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt	120
55	cagcagaagc ctgggcagcc acctaaagctg ctcatccacg ccgcctctaa ccagggatct	180
	gggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc	240
60	tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat	300
	acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa	333

<210> 153

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL2

<400> 153

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 154

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 7 VL2

<400> 154

gaaatcgtag tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60
ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120
cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccacg ccgcctctaa ccagggatct 180
ggggtgcctt caggtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240
tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300
acttttggtg gcgggaccaa ggttgagatc aaa 333

<210> 155

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 898 958 T3

<220>

<223> Dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 155

5 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

10 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30

15 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

20 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

25 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

30 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95

35 Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 156

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 156

45 gaaatcgtagc tcacccagtc acctgcaacc ctttctctga gccccggtga acgtgccact 60

 ctcagctgca gagcaagtga gagtgtggac aattacggca tgtccttcat gaactggttt 120

 cagcagaagc ctgggcagcc acctaagctg ctcattccacg ccgcctctaa ccgcggatct 180

50 gggggtgcctt cacgtttttc tggatcagga agtggcactg acttcaccct tacaatcagc 240

 tctctggagc cagaggactt tgccgtctat ttctgccagc aatctaaaga ggtgccctat 300

55 acttttggtg gcgggaccaa gggtgagatc aaa 333

<210> 157

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDRL1 de the Dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL2 and hPD-1 mAb 7 VL3

<400> 157

	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	
	1				5					10					15	
5	<210> 158 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
10	<220> <223> CDRL2 del Dominio VL de hPD-1 mAb 7 VL3 <400> 158															
15		Ala	Ala	Ser	Asn	Arg	Gly	Ser								
		1				5										
20	<210> 159 <211> 113 <212> PRT <213> Mus musculus <220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(113) <223> Dominio VH de PD-1 mAb 8 <400> 159															
30	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
	1				5					10					15	
35	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
				20					25					30		
40	Tyr	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
45	Gly	Asp	Ile	Asn	Pro	Lys	Asn	Gly	Asp	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
50	Lys	Gly	Glu	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
55	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
60	Ala	Ser	Asp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser
				100					105					110		
65	Ser															
	<210> 160 <211> 339 <212> ADN															

<213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(339)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 8

<400> 160

10 gagggccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gactactaca tgaactgggt gaagcagaac 120
 15 catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaataccta aaaatggtga cactcactac 180
 aaccagaagt tcaagggcga ggccacattg actgtagaca agtcctccac cacagcctac 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc gagcgatttt 300
 20 gactactggg gccaaaggcac cactctcaca gtctcctcc 339

<210> 161
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(5)
 <223> CDRH1 de PD-1 mAb 8

<400> 161

35 Asp Tyr Tyr Met Asn
 1 5

<210> 162
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(17)
 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 8

<400> 162

50 Asp Ile Asn Pro Lys Asn Gly Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

55 Gly

<210> 163
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(4)
 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 8

65

<400> 163

5 Asp Phe Asp Tyr
1

<210> 164
<211> 112
10 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
15 <222> (1)..(112)
<223> Dominio VL de PD-1 mAb 8

<400> 164

20 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Gly Leu Gly
1 5 10 15

25 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser
20 25 30

30 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

35 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

40 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

45 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

50 Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 165
<211> 336
55 <212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
60 <222> (1)..(336)
<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 8

<400> 165

65

ES 2 898 958 T3

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtcg gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gacccttgta tatagtaatg gaaacaccta tttaaattgg 120
5 ttcctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
10 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcca 300
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

15 <210> 166
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(16)
<223> CDRL1 de PD-1 mAb 8

25 <400> 166
Arg Ser Ser Gln Thr Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

30 <210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 de PD-1 mAb 8

40 <400> 167

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

45 <210> 168
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

50 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 de PD-1 mAb 8

55 <400> 168

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Phe Thr
1 5

60 <210> 169
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

65 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(119)
 <223> Dominio VH de PD-1 mAb 9

5 <400> 169

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

10 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

15 Leu Val Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

20 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
 50 55 60

25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

30 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35 Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

40 <210> 170
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(357)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 9

50 <400> 170

gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

55 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatcttg tgtcttgggt tgcgcagact 120

ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggtg gtggtggtaa cacctactat 180

60 tcagacagtg tgaagggctg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240

ctgcaaata gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aaggatatgt 300

ttcgacggcg cctgggtttgc ttactggggc caagggactc tgggtcactgt ctcttcc 357

65

5 <210> 171
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(5)
 <223> CDRH1 de PD-1 mAb 9
 10 <400> 171
 Ser Tyr Leu Val Ser
 15 1 5
 <210> 172
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(17)
 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 9
 25 <400> 172
 Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
 30 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 173
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(10)
 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 9
 45 <400> 173
 Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 50 1 5 10
 <210> 174
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(107)
 <223> Dominio VL de PD-1 mAb 9
 60 <400> 174
 65

ES 2 898 958 T3

[illegible]

<400> 176

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

5

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 de PD-1 mAb 9

15

<400> 177

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala
1 5

20

<210> 178
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

25

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 de PD-1 mAb 9

30

<400> 178

Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp Thr
1 5

35

<210> 179
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH1

45

<400> 179

ES 2 898 958 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Leu	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Ala	Arg	Tyr	Gly	Phe	Asp	Gly	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115													
35	<210> 180																
	<211> 357																
	<212> ADN																
	<213> Secuencia artificial																
40	<220>																
	<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 9 VH1																
	<400> 180																
45	gaggtgcagc tgggtggaaag tggggggcggc ctggtgcgac ccgggggaag tctgaaactg															60	
	tcctgtgcag catcaggatt tactttttca tcttatctcg tgtcttgggt aagacaagca															120	
50	cccgaaaaag gcttggaatg ggtggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat															180	
	agcgacagtg tcaaggggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac															240	
	ctccagatga actccctgcg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga															300	
55	tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggtaaccgt tagctcc															357	
	<210> 181																
	<211> 119																
60	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
	<220>																
65	<223> Dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH2																

ES 2 898 958 T3

<400> 181

5	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Arg Pro Gly Gly	1 5 10 15
10	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	20 25 30
15	Leu Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Thr	35 40 45
20	Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val	50 55 60
25	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	65 70 75 80
30	Leu Gln Met Asn Ser Ala Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys	85 90 95
35	Ala Arg Tyr Gly Phe Asp Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly	100 105 110
40	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115

<210> 182

<211> 357

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 9 VH2

<400> 182

50	gaggtgcagc tgggtggaaag tggggggcggc ctggcgcgac ccggggggaag tctgaaactg	60
55	tcctgtgcag catcaggatt tacttttttca tcttatctcg tgggctgggt aagacaagca	120
60	cccggaaaag gcttggaatg gacggccact atctccggtg gaggtggcaa cacctactat	180
65	agcgacagtg tcaaggggaag atttaccatc agtcgcgaca acgctaagaa tagcctgtac	240
70	ctccagatga actccgcacg cgccgaggac accgccacct attactgtgc acgctatgga	300
75	tttgacggcg catggtttgc ctactgggga cagggcacat tggttaaccgt tagctcc	357

<210> 183

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> CDRH1 del Dominio VH de hPD-1 mAb 9 VH2 Que tiene una sustitución de aminoácidos de serina por glicina

5 <400> 183

Ser Tyr Leu Val Gly
 1 5

10 <210> 184
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL1

<400> 184

20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

30 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

35 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

40 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp
 85 90 95

45 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

50 <210> 185
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 9 VL1

<400> 185

gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc 60
 atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat tcatacctcg cctggtatca acagaaacct 120
 5 ggtaaagccc caaaattgct catttacaac gccaaagccc tcgcagctgg cgtgccaaagt 180
 aggttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc 240
 10 gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa 300
 ggcactaagc tcgagatcaa a 321

15 <210> 186
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2

<400> 186

25 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr
 20 25 30

35 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

40 Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

45 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

50 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Ala Val Pro Trp
 85 90 95

55 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

60 <210> 187
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 9 VL2

65 <400> 187

ES 2 898 958 T3

	gacattcaga tgactcagtc tcccagcagt ctgtccgcat ccgtggggga tcgggtcacc	60
	atcacctgcc gtgcctcaga aaacatctat aactacctcg cctggatatca acagaaacct	120
5	ggtaaagccc caaaattgct catttacgac gccaaagacc tcgcagctgg cgtgccaaagt	180
	aggtttctcag gcagcggctc agggacagat ttcaccctca ccatatcctc actgcagccc	240
10	gaggattttg ccacttacta ctgccagcat cattacgcag tgccctggac cttcggacaa	300
	ggcactaagc tcgagatcaa a	321
15	<210> 188 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> CDRL1 del Dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2 <400> 188	
25	Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Tyr Leu Ala 1 5 10	
30	<210> 189 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> CDRL2 del Dominio VL de hPD-1 mAb 9 VL2	
35	<400> 189	
40	Asp Ala Lys Thr Leu Ala Ala 1 5	
45	<210> 190 <211> 116 <212> PRT <213> Mus musculus <220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(116) <223> Dominio VH de PD-1 mAb 10	
50	<400> 190	

ES 2 898 958 T3

	Glu	Val	Ile	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Leu	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Ser	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90						95		
30	Ala	Arg	Gln	Glu	Leu	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	
			100					105						110			
35	Thr	Val	Ser	Ser													
			115														
40	<210> 191 <211> 348 <212> ADN <213> Mus musculus																
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(348) <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 10																
	<400> 191																
	gaagtgatac	tggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgaagc	ctggaggggc	cctgaaactc											60
50	tcctgtgcag	cctctggatt	cacttttcagt	aactatctca	tgtcttgggt	tcgccagact											120
	ccggagaaga	ggctggagtg	ggtcgcaagt	attagtgggtg	gtggtagtaa	tatctactat											180
55	ccagacagtg	tgaagggctg	attcaccata	tccagggaca	atgccaagaa	caccctgtac											240
	ctgcaaataa	acagtctgag	gtctgaggac	acggccttgt	attactgtgc	aagacaagaa											300
60	ctggcctttg	actactgggg	ccaaggcacc	actctcacag	tctcctcc												348
65	<210> 192 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus																

ES 2 898 958 T3

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(5)
 <223> CDRH1 de PD-1 mAb 10
 5
 <400> 192

 Asn Tyr Leu Met Ser
 1 5
 10
 <210> 193
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(17)
 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 10
 20
 <400> 193

 Ser Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 25
 Gly
 30
 <210> 194
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 10
 40
 <400> 194

 Gln Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
 1 5
 45
 <210> 195
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 50
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(107)
 <223> Dominio VL de PD-1 mAb 10
 55
 <400> 195

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	
	1				5					10					15		
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Thr	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser	Asn	Phe	
				20					25					30			
10	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile	Lys	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
15	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
		50					55					60					
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	Gln	
	65					70					75					80	
25	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Ser	Thr	Leu	Pro	Trp	
					85					90					95		
30	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Ile						
			100						105								
	<210> 196																
	<211> 321																
	<212> ADN																
35	<213> Mus musculus																
	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(321)																
40	<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 10																
	<400> 196																
45	gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc															60	
	atcagttgca ggacaagtca ggacattagc aatttttttaa actggtatca gcagaaacca															120	
	gatggaacta ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca															180	
50	aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa															240	
	gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtagtacgc ttccgtggac gttcgggtgga															300	
55	ggcaccaagc tggaaatcat a															321	
	<210> 197																
	<211> 11																
	<212> PRT																
60	<213> Mus musculus																
	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(11)																
65	<223> CDRL1 de PD-1 mAb 10																

<400> 197

5 Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe Leu Asn
1 5 10

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(7)
15 <223> CDRL2 de PD-1 mAb 10

<400> 198

20 Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 199
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (19) .. (19)
30 <223> CDRL3 de PD-1 mAb 10

<400> 199

35 Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 200
<211> 117
40 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
45 <222> (1)..(117)
<223> Dominio VH de PD-1 mAb 11

<400> 200

50 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr
				20					25					30		
5	Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met
			35					40					45			
10	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ser	Asp	Thr	His	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
15	Lys	Gly	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
20	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Asn	Glu	Asp	Ser	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
25	Thr	Thr	Gly	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr
				100					105					110		
30	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
				115												
	<210> 201															
	<211> 351															
	<212> ADN															
35	<213> Mus musculus															
	<220>															
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC															
	<222> (1)..(351)															
40	<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 11															
	<400> 201															
45	gagggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg															60
	tcctgcaaga cttctggcta cacatttacc ggctactgga tgcactgggt aaaacagagg															120
	cctggacagg gtctgaaatg gatgggggct atttaccctg gaaatagtga tactcactac															180
50	aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccgccag cactgcctac															240
	atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcgatct attactgtac tactgggacc															300
55	tactcgtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc a															351
	<210> 202															
	<211> 5															

<400> 202

5 Gly Tyr Trp Met His
1 5

<210> 203
<211> 17
<212> PRT
10 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(17)
15 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 11

<400> 203

20 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 204
<211> 8
<212> PRT
30 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(8)
35 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 11

<400> 204

40 Gly Thr Tyr Ser Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 205
<211> 106
<212> PRT
45 <213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(106)
50 <223> Dominio VL de PD-1 mAb 11

<400> 205

55 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

ES 2 898 958 T3

	Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser	
	20 25 30	
5	Ile His Trp Tyr Gln His Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile	
	35 40 45	
10	Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
15	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser	
	65 70 75 80	
20	Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr	
	85 90 95	
25	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
	100 105	
	<210> 206	
	<211> 318	
	<212> ADN	
	<213> Mus musculus	
30	<220>	
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC	
	<222> (1)..(318)	
	<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 11	
35	<400> 206	
	gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt	60
40	ttctcctgca gggccagtc gagcattggc acaagcatat actggtatca gcacagaaca	120
	aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc	180
45	aggttttagtg gcagtggatc agggactgat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct	240
	gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa agtaatagct ggctcacgtt cgggtgctggg	300
	accaagctgg agctgaaa	318
50	<210> 207	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
55	<220>	
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC	
	<222> (1)..(11)	
	<223> CDRL1 de PD-1 mAb 11	
60	<400> 207	
	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His	
65	1 5 10	

<210> 208
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 10 <223> CDRL2 de PD-1 mAb 11

 <400> 208

 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 15 1 5

 <210> 209
 <211> 8
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(8)
 25 <223> CDRL3 de PD-1 mAb 11

 <400> 209

 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Leu Thr
 30 1 5

 <210> 210
 <211> 125
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(125)
 40 <223> Dominio VH de PD-1 mAb 12

 <400> 210

 Gln Gly His Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 45 1 5 10 15

 Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 50 20 25 30

 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 55 35 40 45

 Gly Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

ES 2 898 958 T3

	50	55	60
5	Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Thr Tyr 65 70 75 80		
10	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys 85 90 95		
15	Ser Arg Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe 100 105 110		
20	Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 115 120 125		
25	<210> 211 <211> 375 <212> ADN <213> Mus musculus		
30	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(375) <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 12		
35	<400> 211 caggggcacc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60 tcctgcaagg cttcgggctt cacatttact gactatgaga tgcaactgggt gaaacagaca 120 cctgtgcatg gcctggaatg gattgggact attgatcctg aaactgggtg tactgcctac 180 aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg acagtagaca aatcttccac tacaacctac 240 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct tttattgttc aagagagagg 300 attactacgg ttgttgaggg ggcatactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg 360 gtcaccgtct cctca 375		
40	<210> 212 <211> 5 <212> PRT <213> Mus musculus		
45	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(5) <223> CDRH1 de PD-1 mAb 12		
50	<400> 212 Asp Tyr Glu Met His 1 5		
55	<210> 213 <211> 17 <212> PRT		
60			
65			

<213> Mus musculus

 $\langle 220 \rangle$

<221> CARACTERÍSTICA MISC

<222> (1)..(17)

<223> CDRH2 de PD-1 mAb 12

<400> 213

Thr Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 214

 $\langle 211 \rangle$ 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

 $\langle 220 \rangle$

<221> CARACTERÍSTICA MISC

<222> (1)..(16)

<223> CDRH3 de PD-1 mAb 12

<400> 214

Glu Arg Ile Thr Thr Val Val Glu Gly Ala Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 215

$\langle 211 \rangle$ 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISC

<222> (1)..(112)

<223> Dominio VL de PD-1 mAb 4

<400> 215

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Cys Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

5 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

10 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

15 Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 216
<211> 336
20 <212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
25 <222> (1)..(336)
<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 12

<400> 216

30 gatgttttga tgaccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gaacattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
35 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct gcaaagtttc cacccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattattgct ttcaagggtc acatgttccg 300
40 tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 217
<211> 16
45 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
50 <222> (1)..(16)
<223> CDRL1 de PD-1 mAb 12

<400> 217

55 Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 218
<211> 7
60 <212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
65 <222> (1)..(7)

<223> CDRL2 de PD-1 mAb 12

<400> 218

5 Lys Val Ser Thr Arg Phe Ser
 1 5

<210> 219

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(9)

<223> CDRL3 de PD-1 mAb 12

<400> 219

20 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 220

<211> 121

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

30 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(121)

<223> Dominio VH de PD-1 mAb 13

<400> 220

35 Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

40 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30

45 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

50 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

60 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

ES 2 898 958 T3

		85		90		95	
5	Ala Arg Gln Ala Tyr Tyr Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly	100		105		110	
10	Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	115		120			
	<210> 221						
	<211> 363						
15	<212> ADN						
	<213> Mus musculus						
	<220>						
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC						
	<222> (1)..(363)						
20	<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 13						
	<400> 221						
25	gaagtgatgc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc					60	
	tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agccatacca tgtcttgggt tgcgcagact					120	
	ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggtg gtggttctaa tatctactat					180	
30	ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac					240	
	ctgcaaata gaagtcctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagacaagct					300	
35	tactacggta attactggta ctctgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc					360	
	tcc					363	
	<210> 222						
40	<211> 5						
	<212> PRT						
	<213> Mus musculus						
	<220>						
45	<221> CARACTERÍSTICA_MISC						
	<222> (1)..(5)						
	<223> CDRH1 de PD-1 mAb 13						
	<400> 222						
50			Ser His Thr Met Ser				
			1		5		
55	<210> 223						
	<211> 17						
	<212> PRT						
	<213> Mus musculus						
60	<220>						
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC						
	<222> (1)..(17)						
	<223> CDRH2 de PD-1 mAb 13						
65	<400> 223						

	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
	1				5					10					15	
5	Gly															
	<210> 224															
	<211> 12															
10	<212> PRT															
	<213> Mus musculus															
	<220>															
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC															
15	<222> (1)..(12)															
	<223> CDRH3 de PD-1 mAb 13															
	<400> 224															
20				Gln	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	
				1				5					10			
	<210> 225															
25	<211> 107															
	<212> PRT															
	<213> Mus musculus															
	<220>															
30	<221> CARACTERÍSTICA_MISC															
	<222> (1)..(107)															
	<223> Dominio VL de PD-1 mAb 13															
	<400> 225															
35	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Gln	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly
	1				5					10					15	
40	Glu	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Gly	Thr	Trp
				20					25					30		
45	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
50	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55					60				
55	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Phe	Ser	Phe	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala
	65					70					75					80
	Glu	Asp	Phe	Val	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Leu	Asp	Ser	Ile	Pro	Trp
60					85					90					95	
	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
65				100					105							

<210> 226
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 5
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(321)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 13
 10
 <400> 226
 gacattcaga tgacccagtc tcttgccacc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc 60
 15 atcacgtgcc tggcaagtca gaccattggg acatgggttag catgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctgagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca 180
 20 aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct 240
 gaagattttg taagttatta ctgtcaacaa cttgacagta ttccgtggac gttcggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321
 25
 <210> 227
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(11)
 <223> CDRL1 de PD-1 mAb 13
 35
 <400> 227
 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
 40 1 5 10
 <210> 228
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL2 de PD-1 mAb 13
 50
 <400> 228
 Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
 55 1 5
 <210> 229
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(9)
 65

ES 2 898 958 T3

<223> CDRL3 de PD-1 mAb 13

<400> 229

5 Gln Gln Leu Asp Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 230

10 <211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

15 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(117)

<223> Dominio VH de PD-1 mAb 14

<400> 230

20 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

25 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

30 Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Ile
35 40 45

35 Gly Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

40 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

45 Met His Leu Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

50 Ala Thr Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

55 115

<210> 231

<211> 351

60 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

65 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (1)..(351)

ES 2 898 958 T3

<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 14

<400> 231

5	caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagatg	60
	tcctgcaagg cttctggcta caacttcacg agctactgga taacctgggt gaaacagagg	120
10	cctggacaag gccttcagtg gattggaaat atttatcctg gtactgatgg tactacctac	180
	aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca catcctccag cacagcctac	240
	atgcacctca gtcgcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aactgggcta	300
15	cactgggtact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc c	351

<210> 232

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

25 <222> (1)..(5)

<223> CDRH1 de PD-1 mAb 14

<400> 232

30		Ser Tyr Trp Ile Thr
		1 5

<210> 233

<211> 17

35 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

40 <222> (1)..(17)

<223> CDRH2 de PD-1 mAb 14

<400> 233

45	Asn Ile Tyr Pro Gly Thr Asp Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
	1 5 10 15

50 Ser

<210> 234

<211> 8

<212> PRT

55 <213> Mus musculus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

60 <222> (1)..(8)

<223> CDRH3 de PD-1 mAb 14

<400> 234

65	Gly Leu His Trp Tyr Phe Asp Val
	1 5

<210> 235
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(107)
 <223> Dominio VL de PD-1 mAb 14

10

<400> 235

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn
 20 25 30

20

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

25

Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

30

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

35

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

40

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

45

<210> 236
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

50

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(321)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 14

<400> 236

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagt 60
 gtcacctgca aggccagtc gagtgtgggt actaatgtag cctggatatca acagaagccc 120
 5 ggtcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatacctccc gattcagtgg cgtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtaa tgtgcagtct 240
 10 gaagacttgg cagagtatct ctgtcagcaa tataacagct atccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa a 321

15 <210> 237
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(11)
 <223> CDRL1 de PD-1 mAb 14

25 <400> 237

Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

30 <210> 238
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(7)
 <223> CDRL2 de PD-1 mAb 14

40 <400> 238

Ser Ala Ser Ser Arg Phe Ser
 1 5

45 <210> 239
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(9)
 <223> CDRL3 de PD-1 mAb 14

55 <400> 239

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

60 <210> 240
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

65 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(117)
 <223> Dominio VH de PD-1 mAb 15

5 <400> 240

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

10

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

15

Leu Ile Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

20

Ala Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

25

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

30

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35

Thr Arg Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

40

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 241
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

45

<220>
 <221> misc-feature
 <222> (1)..(351)
 <223> Polinucleótido que codifica el Dominio VH de PD-1 mAb 15

50

<400> 241

gaagtgatgc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cattttcagt agctatctca tctcttgggt tgcgcagact 120
 ccggagaaga ggctggagtg ggtcgctgcc attagtgggtg gtgggtgctga cacctactat 180
 gccgacagtg tgaagggctg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240
 ctgcaaata gcaagtctgag gtctgaggac acggccttat attactgtac aagacgaggg 300
 acctatgcta tggactactg ggggtcaagga acctcagtc ccgctctctc c 351

65

5 <210> 242
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(5)
 <223> CDRH1 de PD-1 mAb 15
 10 <400> 242
 Ser Tyr Leu Ile Ser
 15 1 5
 <210> 243
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(17)
 25 <223> CDRH2 de PD-1 mAb 15
 <400> 243
 Ala Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 30 1 5 10 15
 Gly
 35 <210> 244
 <211> 8
 <212> PRT
 40 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(8)
 45 <223> CDRH3 de PD-1 mAb 15
 <400> 244
 Arg Gly Thr Tyr Ala Met Asp Tyr
 50 1 5
 <210> 245
 <211> 107
 <212> PRT
 55 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(107)
 60 <223> Dominio VL de PD-1 mAb 15
 <400> 245
 65

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Gln	Ser	Ala	Ser	Leu	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Gly	Thr	Trp	
				20					25					30			
10	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
15	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50						55					60					
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Phe	Ser	Phe	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	
	65					70					75					80	
25	Glu	Asp	Phe	Val	Asn	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Leu	Tyr	Ser	Ile	Pro	Trp	
					85					90					95		
30	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
				100					105								
	<210> 246																
	<211> 321																
	<212> ADN																
	<213> Mus musculus																
35	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(321)																
	<223> Polinucleótido que codifica el Dominio VL de PD-1 mAb 15																
40	<400> 246																
	gacattcaga tgaccagtc tccgcctcc cagtctgcat ctctgggaga aagtgtcacc																60
45	atcacatgcc tggcaagtca gaccattggt acatgggttag catgggtatca gcagaaacca																120
	gggaaatctc ctgagctcct gatttatgct gcaaccagct tggcagatgg ggtcccatca																180
50	aggttcagtg gtagtggatc tggcacaaaa ttttctttca agatcagcag cctacaggct																240
	gaagattttg taaattatta ctgtcaacaa ctttacagta ttccgtggac gttcgggtgga																300
	ggcaccaagc tggaaatcaa a																321
55	<210> 247																
	<211> 11																
	<212> PRT																
	<213> Mus musculus																
60	<220>																
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																
	<222> (1)..(11)																
	<223> CDRL1 de PD-1 mAb 15																
65																	

<400> 247

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Ala
1 5 10

5

<210> 248
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(7)
<223> CDRL2 de PD-1 mAb 15

15

<400> 248

Ala Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

20

<210> 249
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

25

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(9)
<223> CDRL3 de PD-1 mAb 15

30

<400> 249

Gln Gln Leu Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

35

<210> 250
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Dominio VH de hPD-1 mAb 15 VH1

45

<400> 250

ES 2 898 958 T3

	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Leu	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
			35					40					45				
15	Ala	Ala	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
		50					55					60					
20	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
30	Ala	Arg	Arg	Gly	Thr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
				100					105					110			
35	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
				115													
40	<210> 251 <211> 351 <212> ADN <213> Secuencia artificial																
45	<220> <223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 15 VH1 <400> 251																
	gaagtgcaac	tggttgaaag	tggcggcggg	ctggtgcggc	caggtggttc	actcagactg											60
	tcttgtgcag	cttcaggctt	tacattctcc	tcttatctta	tctcttgggt	gcgccaagcc											120
50	ccaggtaagg	gccttgaatg	ggtcgccgcc	attagtgggg	gtggtgccga	tacatattat											180
	gccgacagcg	tcaagggacg	tttcaccatc	agcagggaca	acgccaagaa	tagcctttac											240
55	ctgcagatga	actcacttag	agctgaagac	accgctactt	attactgtgc	ccggcgcggg											300
	acttacgcta	tggactattg	gggccagggc	accttggtca	ctgtctcatc	c											351
60	<210> 252 <211> 107 <212> PRT <213> Secuencia artificial																
65	<220> <223> Dominio VH de hPD-1 mAb 15 VL1																

<400> 252

5	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
10	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Gly	Thr	Trp
				20					25					30		
15	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
20	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
25	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
30	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Leu	Tyr	Ser	Ile	Pro	Trp
					85					90					95	
35	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105							

<210> 253
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polinucleótido que codifica el hPD-1 mAb 15 VL1

<400> 253

45	gatatccaga	tgacccagtc	tcccagctct	ctcagtgcaa	gcgtaggcga	ccgtgtgacc	60
	atcacctgtc	tggccagtc	gaccattgga	acctggctcg	cctgggtatca	gcagaaacct	120
50	ggcaaggccc	ctaagctgct	gatttaacgc	gccacctccc	tcgcagatgg	agtgccctcc	180
	cgatttagcg	ggtccgggtc	cggcaccgac	ttcacattca	caatcagcag	cctccagccc	240
55	gaggatttcg	ctacatacta	ctgtcaacag	ctctactcca	ttccatggac	ctttggtcag	300
	ggtactaaac	tggagatcaa	a				321

<210> 254
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (1)..(98)

ES 2 898 958 T3

<223> Dominio CH1 de IgG4 humana

<400> 254

5	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
	1				5					10					15	
10	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
15	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
20	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50						55					60				
25	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
	65					70					75					80
30	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
	Arg	Val														

35 <210> 255
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cadena pesada del anticuerpo humanizado IgG1

<400> 255

45	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
	1				5					10					15	
50	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
55	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
60	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser

ES 2 898 958 T3

	50					55					60					
5	Leu 65	Ser	Ser	Val	Val	Thr 70	Val	Pro	Ser	Ser	Ser 75	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr 80
10	Tyr	Ile	Cys	Asn 85	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser 90	Asn	Thr	Lys	Val	Asp 95	Lys
15	Arg	Val	Glu	Pro 100	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys 105	Thr	His	Thr	Cys	Pro 110	Pro	Cys
20	Pro	Ala	Pro	Glu 115	Ala	Ala	Gly	Gly 120	Pro	Ser	Val	Phe	Leu 125	Phe	Pro	Pro
25	Lys	Pro 130	Lys	Asp	Thr	Leu	Met 135	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro 140	Glu	Val	Thr	Cys
30	Val 145	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu 155	Val	Lys	Phe	Asn	Trp 160
35	Tyr	Val	Asp	Gly 165	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala 170	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg 175	Glu
40	Glu	Gln	Tyr	Asn 180	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val 185	Val	Ser	Val	Leu	Thr 190	Val	Leu
45	His	Gln	Asp 195	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys 200	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys 205	Val	Ser	Asn
50	Lys	Ala 210	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 215	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser 220	Lys	Ala	Lys	Gly
55	Gln 225	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 230	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 235	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu 240
60	Met	Thr	Lys	Asn 245	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 250	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 255	Tyr
65	Pro	Ser	Asp	Ile 260	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 265	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 270	Glu	Asn
	Asn	Tyr	Lys 275	Thr	Thr	Pro	Pro	Val 280	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 285	Ser	Phe	Phe
	Leu	Tyr 290	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 295	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp 300	Gln	Gln	Gly	Asn

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

5 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 256

<211> 326

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cadena pesada de anticuerpo humanizado de IgG4 con región bisagra estabilizada

<400> 256

ES 2 898 958 T3

	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	
	1				5					10					15		
5	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				20					25					30			
10	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45				
15	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		50					55					60					
20	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	
	65					70				75						80	
25	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85						90					95		
30	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				100					105					110			
35	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
			115					120					125				
40	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
		130					135					140					
45	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
	145					150					155					160	
50	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
					165					170					175		
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	

ES 2 898 958 T3

	180							185							190						
5	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu					
			195					200					205								
10	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg					
		210					215					220									
15	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys					
	225					230					235					240					
20	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp					
					245					250					255						
25	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys					
			260						265					270							
30	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser					
			275					280					285								
35	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser					
	290						295					300									
40	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser					
	305					310					315					320					
45	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly															
					325																
50	<210> 257																				
	<211> 98																				
	<212> PRT																				
	<213> Homo sapiens																				
55	<220>																				
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC																				
	<222> (1)..(98)																				
	<223> Dominio CH1 de IgG2 humana																				
	<400> 257																				

ES 2 898 958 T3

	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
	1				5					10					15	
5	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
				20					25					30		
10	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35					40					45			
15	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
		50					55					60				
20	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
	65					70					75					80
25	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
				85						90					95	
	Thr Val															
30	<210> 258															
	<211> 217															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
35	<220>															
	<223> Secuencia de IgG1 para los Dominios CH2 y CH3															
	<220>															
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC															
40	<222> (217)..(217)															
	<223> Xaa es una lisina (K) o está ausente															
	<400> 258															

ES 2 898 958 T3

	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
	1				5					10					15		
5	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
				20					25					30			
10	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
			35					40					45				
15	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
		50					55					60					
20	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
	65					70					75					80	
25	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
				85						90					95		
30	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
				100					105					110			
35	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
			115					120					125				
40	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
		130					135					140					
45	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
	145					150					155					160	
50	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
					165					170					175		
55	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
				180				185						190			
60	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
			195					200					205				
65	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Xaa								
		210					215										

<210> 259

<211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia IgG4 para los Dominios CH2 y CH3

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (217)..(217)
 <223> Xaa es una lisina (K) o está ausente

<400> 259

5		Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
		1				5					10					15	
10		Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
					20					25					30		
15		Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
				35					40					45			
20		Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
			50					55					60				
25		Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
		65					70					75					80
30		Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys

ES 2 898 958 T3

	85	90	95
5	Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 100 105 110		
10	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met 115 120 125		
15	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 130 135 140		
20	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 145 150 155 160		
25	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 165 170 175		
30	Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val 180 185 190		
35	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 195 200 205		
40	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Xaa 210 215		
45	<210> 260 <211> 217 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
50	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (4)..(5) <223> Xaa4 y Xaa5 son ambos L (tipo salvaje), o son ambos A (unión a FcgammaR disminuida)		
55	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (22)..(26) <223> Xaa22, Xaa24 y Xaa26 respectivamente are M, S y T (tipo salvaje), o son Y, T y E (vida media ampliada)		
60	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (136)..(177) <223> Xaa136, Xaa138, y Xaa177 son respectivamente: T, L y Y (tipo salvaje), o son W, L y Y (botón), o S, A y V (agujero)		
65	<220> <221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (204)..(205)		

<223> Xaa204 y Xaa205 son respectivamente N y H (tipo salvaje), o son N y R (sin unión a proteína A), o A y K (sin unión a proteína A)

5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (217)..(217)
<223> Xaa217 es K o está ausente

<400> 260

ES 2 898 958 T3

[illegible]

<220>
<223> Conector 2 Alternativo

5 <400> 261

Leu Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

10 <210> 262
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Conector 3

20 <400> 262

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10

25 <210> 263
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Conector 3

<400> 263

35 Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

40 <210> 264
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena Ligera de un Anticuerpo de PD-1 humanizado (hPD-1 mAb 7(1.2))

45 <400> 264

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

50 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
20 25 30

ES 2 898 958 T3

	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			35					40					45				
5	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50						55					60					
10	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70					75					80	
15	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		
20	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	
				100					105					110			
25	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	
			115					120					125				
30	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	
	130						135					140					
35	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	
	145					150					155					160	
40	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	
				165					170						175		
45	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	
				180					185					190			
50	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	
		195					200						205				
55	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
	210					215											
60	<210> 265																
	<211> 448																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
65	<220>																
	<223> Cadena Pesada de un Anticuerpo Humanizado ((hPD-1 mAb 7(1.2))																
	<400> 265																
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10				15			

ES 2 898 958 T3

	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20						25					30		
5	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35					40					45			
10	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
15	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
20	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
25	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
30	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115					120					125			
35	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
		130					135					140				
40	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155					160
45	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165						170					175	
50	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190		
55	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200					205			
60	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220				
65	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240
70	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245						250					255	
75	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270		

ES 2 898 958 T3

	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
			275					280					285				
5	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
		290					295					300					
10	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
	305					310					315					320	
15	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
					325					330					335		
20	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
				340					345					350			
25	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
			355					360					365				
30	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
		370					375					380					
35	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
	385					390					395					400	
40	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
					405					410					415		
45	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
				420					425					430			
50	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
			435					440					445				
55	<210> 266 <211> 445 <212> PRT <213> Secuencia artificial																
60	<220> <223> Cadena Pesada de un Anticuerpo Humanizado ((hPD-1 mAb 7(1.2))																
65	<400> 266																
	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
60	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			

ES 2 898 958 T3

	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
5	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	
	50						55					60					
10	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
15	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
20	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
25	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
30	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
35	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
40	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
45	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
50	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
55	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	
		210					215					220					
60	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
	225					230					235					240	
65	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	
					245					250					255		
70	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	
				260					265					270			
75	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	
			275					280					285				

	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290						295					300				
5	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
	305					310					315					320
10	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
					325					330					335	
15	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
				340					345					350		
20	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
			355					360					365			
25	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
	370						375					380				
30	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
	385					390					395					400
35	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
					405					410					415	
40	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
				420					425					430		
45	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly			
			435					440					445			
50	<210> 267															
	<211> 501															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
55	<220>															
	<223> Primera y Tercera Cadenas Polipeptídicas de DART A															
60	<220>															
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC															
	<222> (34)..(34)															
	<223> Xaa34 es A o G															
65	<220>															
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC															
	<222> (307)..(307)															
	<223> Xaa307 es Y o M															
70	<220>															
	<221> CARACTERÍSTICA_MISC															
	<222> (309)..(309)															
	<223> Xaa309 es T o S															

5 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (311)..(311)
 <223> Xaa311 es E o T

 <400> 267

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30			
10	Asp	Xaa	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	
			35					40					45				
15	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
20	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65					70					75					80	
25	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	
					85					90					95		
30	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110			
35	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	
			115					120					125				
40	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	
		130					135					140					
45	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
	145					150					155					160	
50	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	
					165					170					175		
55	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	
				180					185					190			
60	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	
			195					200					205				
65	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	

ES 2 898 958 T3

	210					215					220					
5	Pro 225	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly 230	Gln	Gly	Thr	Leu	Val 235	Thr	Val	Ser	Ser	Gly 240
10	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly 245	Glu	Val	Ala	Ala	Cys 250	Glu	Lys	Glu	Val	Ala 255	Ala
15	Leu	Glu	Lys	Glu 260	Val	Ala	Ala	Leu	Glu 265	Lys	Glu	Val	Ala	Ala 270	Leu	Glu
20	Lys	Glu	Ser 275	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro 280	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro 285	Ala	Pro	Glu
25	Phe 290	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val 295	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 300	Lys	Pro	Lys	Asp
30	Thr 305	Leu	Xaa	Ile	Xaa	Arg 310	Xaa	Pro	Glu	Val	Thr 315	Cys	Val	Val	Val	Asp 320
35	Val	Ser	Gln	Glu	Asp 325	Pro	Glu	Val	Gln	Phe 330	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 335	Gly
40	Val	Glu	Val	His 340	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 345	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 350	Phe	Asn
45	Ser	Thr	Tyr 355	Arg	Val	Val	Ser	Val 360	Leu	Thr	Val	Leu	His 365	Gln	Asp	Trp
50	Leu 370	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 375	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 380	Lys	Gly	Leu	Pro
55	Ser 385	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr 390	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 395	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 400
60	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr 405	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln 410	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 415	Asn
65	Gln	Val	Ser	Leu 420	Thr	Cys	Leu	Val	Lys 425	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
	Ala	Val	Glu 435	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 440	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 445	Tyr	Lys	Thr
	Thr 450	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser 455	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 460	Leu	Tyr	Ser	Arg

ES 2 898 958 T3

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
465 470 475 480

5 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 485 490 495

10 Ser Leu Ser Leu Gly
 500

15 <210> 268
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Segunda y Cuarta Cadenas Polipeptídicas de DART A
<400> 268

ES 2 898 958 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			35					40					45				
15	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50						55					60					
20	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70					75					80	
25	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		
30	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
				100					105					110			
35	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	
			115					120					125				
40	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
	130						135					140					
45	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	
	145					150					155					160	
	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	

ES 2 898 958 T3

				165					170					175			
5	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp	
				180					185					190			
10	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	
			195					200					205				
15	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	
		210					215					220					
20	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	
	225					230					235					240	
25	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	
					245					250					255		
30	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	
				260					265					270			
35	Glu																
	<210>	269															
	<211>	571															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
40	<220>																
	<223>	Primera y Tercera Cadenas Polipeptídicas de DART D															
45	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
50	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
				20					25					30			
55	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
		35						40					45				
60	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50						55					60					
65	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70				75						80	
65	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		

ES 2 898 958 T3

	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly
				100					105					110		
5	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala
			115					120					125			
10	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser
		130					135					140				
15	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
	145					150					155					160
20	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu
					165					170					175	
25	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp
				180					185					190		
30	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu
			195					200					205			
35	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr
		210					215					220				
40	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Leu
	225					230					235					240
45	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
					245					250					255	
50	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
				260					265					270		
55	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
			275					280					285			
60	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
		290					295					300				
65	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
	305					310					315					320
70	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn
					325					330					335	
75	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro

ES 2 898 958 T3

	340	345	350
5	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 355 360 365		
10	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val 370 375 380		
15	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe 385 390 395 400		
20	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 405 410 415		
25	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 420 425 430		
30	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 435 440 445		
35	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 450 455 460		
40	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln 465 470 475 480		
45	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 485 490 495		
50	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 500 505 510		
55	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 515 520 525		
60	Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu 530 535 540		
65	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 545 550 555 560		
	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly 565 570		

<210> 270
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Segunda y Cuarta Cadenas Polipeptídicas de DART D

5

<400> 270

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30			
10	Asp	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	
			35					40					45				
15	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
20	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65					70					75					80	
25	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	
					85					90					95		
30	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110			
35	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	
			115					120					125				
40	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	
		130					135					140					
45	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
	145					150					155					160	
50	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	
					165					170					175		
55	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	
				180					185					190			
60	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	
			195					200					205				
65	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	
		210					215					220					
70	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	

ES 2 898 958 T3

	225				230					235					240	
5	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 245	Arg	Thr	Val	Ala	Ala 250	Pro	Ser	Val	Phe	Ile 255	Phe
10	Pro	Pro	Ser	Asp 260	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser 265	Gly	Thr	Ala	Ser	Val 270	Val	Cys
15	Leu	Leu	Asn 275	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg 280	Glu	Ala	Lys	Val	Gln 285	Trp	Lys	Val
20	Asp	Asn 290	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly 295	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser 300	Val	Thr	Glu	Gln
25	Asp 305	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr 310	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 315	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser 320
30	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu 325	Lys	His	Lys	Val	Tyr 330	Ala	Cys	Glu	Val	Thr 335	His
35	Gln	Gly	Leu	Ser 340	Ser	Pro	Val	Thr	Lys 345	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly 350	Glu	Cys
40	<210> 271 <211> 571 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Primera y Tercera Cadenas Polipeptídicas de DART E <400> 271															
45	Asp 1	Ile	Val	Met	Thr 5	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser 10	Leu	Ser	Val	Thr	Pro 15	Gly
50	Gln	Pro	Ala	Ser 20	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser 25	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu 30	His	Ser
55	Asp	Ala	Lys 35	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp 40	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro 45	Gly	Gln	Pro
60	Pro	Glu 50	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu 55	Val	Ser	Glu	Leu	Asp 60	Ser	Gly	Val	Pro
65	Asp 65	Arg	Phe	Ser	Gly 70	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp 75	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile 80
65	Ser	Arg	Val	Glu	Ala 85	Glu	Asp	Val	Gly	Val 90	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln 95	Gly

ES 2 898 958 T3

	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
5	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly
			115					120					125			
10	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala
		130					135					140				
15	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala
	145					150					155					160
20	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser
					165					170					175	
25	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val
				180					185					190		
30	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser
			195					200					205			
35	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser
		210					215					220				
40	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Leu
	225					230					235					240
45	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
					245					250					255	
50	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
				260					265					270		
55	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
			275					280					285			
60	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
		290					295					300				
65	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
	305					310					315					320
70	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn
					325					330					335	
75	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro

ES 2 898 958 T3

	340	345	350
5	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 355 360 365		
10	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val 370 375 380		
15	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe 385 390 395 400		
20	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 405 410 415		
25	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr 420 425 430		
30	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 435 440 445		
35	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 450 455 460		
40	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln 465 470 475 480		
45	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 485 490 495		
50	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 500 505 510		
55	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 515 520 525		
60	Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu 530 535 540		
65	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 545 550 555 560		
	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly 565 570		

<210> 272
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Segunda y Cuarta Cadenas Polipeptídicas de DART E

5

<400> 272

ES 2 898 958 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			35					40					45				
15	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50						55					60					
20	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70					75					80	
25	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		
30	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
				100					105					110			
35	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	
			115					120					125				
40	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
		130					135					140					
45	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	
	145					150					155					160	
50	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	
					165					170					175		
55	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp	
				180					185					190			
60	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	
			195					200					205				
65	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	
		210					215					220					
70	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	

ES 2 898 958 T3

	225				230					235					240	
5	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly 245	Arg	Thr	Val	Ala	Ala 250	Pro	Ser	Val	Phe	Ile 255	Phe
10	Pro	Pro	Ser	Asp 260	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser 265	Gly	Thr	Ala	Ser	Val 270	Val	Cys
15	Leu	Leu	Asn 275	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg 280	Glu	Ala	Lys	Val	Gln 285	Trp	Lys	Val
20	Asp	Asn 290	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly 295	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser 300	Val	Thr	Glu	Gln
25	Asp 305	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr 310	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser 315	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser 320
30	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu 325	Lys	His	Lys	Val	Tyr 330	Ala	Cys	Glu	Val	Thr 335	His
35	Gln	Gly	Leu	Ser 340	Ser	Pro	Val	Thr	Lys 345	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly 350	Glu	Cys
40	<210> 273 <211> 448 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Primara Cadena Polipeptídica de DART F <400> 273															
45	Gln 1	Val	Gln	Leu	Val 5	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu 10	Val	Lys	Lys	Pro	Gly 15	Ala
50	Ser	Val	Lys	Val 20	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser 25	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr 30	Ser	Tyr
55	Trp	Met	Asn 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ala 40	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Ile
60	Gly 50	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp 55	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu 60	Asp	Gln	Lys	Phe
65	Lys 65	Asp	Arg	Val	Thr	Ile 70	Thr	Val	Asp	Lys	Ser 75	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr 80
70	Met	Glu	Leu	Ser	Ser 85	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys

ES 2 898 958 T3

	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
				100					105					110		
5	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			115					120					125			
10	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
		130					135					140				
15	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155					160
20	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165					170					175	
25	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190		
30	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200					205			
35	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220				
40	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240
45	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr
				245						250					255	
50	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265					270		
55	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275						280					285			
60	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290					295					300				
65	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
	305					310					315					320
70	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325						330					335	
75	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr

ES 2 898 958 T3

	340					345					350					
5	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser
			355					360					365			
10	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
		370					375					380				
15	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
	385					390					395					400
20	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
					405					410					415	
25	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				420					425					430		
30	Ala	Leu	His	Ala	Lys	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
			435					440					445			
	<210> 274															
	<211> 218															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
	<223> Segunda y Quinta Cadenas Polipeptídicas de DART F															
35	<400> 274															
40	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	1				5					10					15	
45	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr
				20					25					30		
50	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
			35					40					45			
55	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
	50						55					60				
60	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
	65					70					75					80
65	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys
					85					90					95	
	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				100					105					110		

ES 2 898 958 T3

	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	
			115					120					125				
5	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	
		130					135					140					
10	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	
	145					150					155					160	
15	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	
				165						170					175		
20	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	
				180					185					190			
25	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	
			195					200					205				
30	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
		210					215										
35	<210> 275																
	<211> 732																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
40	<220>																
	<223> Tercera Cadena Polipeptídica de DART F																
	<400> 275																
45	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
50	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
55	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
60	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	
		50					55					60					
65	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
70	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		

ES 2 898 958 T3

	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
5	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
10	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
15	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
20	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
25	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
30	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
35	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
		210					215					220					
40	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
45	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	
				245						250					255		
50	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
				260					265					270			
55	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		275						280					285				
60	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
	290						295					300					
65	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
	305					310					315					320	
70	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	
				325						330					335		
75	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
				340					345					350			

ES 2 898 958 T3

	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp
			355					360					365			
5	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
		370					375					380				
10	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
	385					390					395					400
15	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
					405					410					415	
20	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				420					425					430		
25	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
			435					440					445			
30	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr
		450					455					460				
35	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile
	465					470					475					480
40	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	Asp	Ala	Lys	Thr	Tyr
					485					490					495	
45	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile
				500					505					510		
50	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
			515					520					525			
55	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala
		530					535					540				
60	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	Thr	His	Phe	Pro	Tyr
	545					550					555					560
65	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
					565					570					575	
70	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
				580					585					590		
75	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe

ES 2 898 958 T3

	595	600	605	
5	Thr Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu 610 615 620			
10	Glu Trp Ile Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp 625 630 635 640			
15	Gln Lys Phe Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser 645 650 655			
20	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val 660 665 670			
25	Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp 675 680 685			
30	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly 690 695 700			
35	Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys 705 710 715 720			
40	Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys 725 730			
45	<210> 276 <211> 273 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Cuarta Cadena Polipeptídica de DART F <400> 276			

ES 2 898 958 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			35					40					45				
15	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
		50					55					60					
20	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70					75					80	

ES 2 898 958 T3

	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys
					85					90					95	
5	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly
				100					105					110		
10	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala
			115					120					125			
15	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser
		130					135					140				
20	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
	145					150					155					160
25	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu
				165						170					175	
30	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp
				180					185					190		
35	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu
			195					200					205			
40	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr
		210					215					220				
45	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
	225					230					235					240
50	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala
				245						250					255	
55	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys
			260					265					270			
60	Glu															
65	<210>	277														
	<211>	449														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	Primera Cadena Polipeptídica de DART G														
	<400>	277														

ES 2 898 958 T3

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
5	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	
		50					55					60					
20	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
35	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
40	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
45	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
50	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
55	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
60	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
65	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
70	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
75	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	
				245						250					255		

ES 2 898 958 T3

	Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	260	265	270
5	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His	275	280	285
10	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	290	295	300
15	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	305	310	315
20	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	325	330	335
25	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	340	345	350
30	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	355	360	365
35	Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	370	375	380
40	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	385	390	395
45	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp	405	410	415
50	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	420	425	430
55	Glu Ala Leu His Ala Lys Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	435	440	445
60	Gly			
65	<210> 278 <211> 219 <212> PRT <213> Secuencia artificial			
	<220> <223> Segunda y Quinta Cadenas Polipeptídicas de DART G			
	<400> 278			

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30			
10	Asp	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	
			35					40					45				
15	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
20	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65					70					75					80	
25	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	
					85					90					95		
30	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110			
35	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
			115					120					125				
40	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
		130					135					140					
45	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
	145					150					155					160	
50	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
					165					170					175		
55	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
				180					185					190			
60	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
			195					200					205				
65	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
		210					215										

<210> 279

<211> 732

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tercera Cadena Polipeptídica de DART G

5

<400> 279

ES 2 898 958 T3

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
5	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	
	50						55					60					
20	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
35	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
40	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
45	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
50	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
55	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
60	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
65	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
		210					215					220					
70	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
	225					230					235					240	

	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	
					245					250					255		
5	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				260					265					270			
10	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			275					280					285				
15	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
		290					295					300					
20	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305					310					315					320	
25	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325					330					335		
30	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
				340					345					350			
35	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
			355					360					365				
40	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
		370					375					380					
45	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385					390					395					400	
50	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405					410					415		
55	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
				420					425					430			
60	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
			435					440					445				
65	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	
		450					455					460					
70	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	
	465					470					475					480	
75	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	Gly	Met	Ser	Phe	
				485						490					495		

ES 2 898 958 T3

	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
				500					505					510		
5	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
			515					520					525			
10	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
		530					535					540				
15	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	Glu	Val	Pro	Tyr
	545					550					555					560
20	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
					565					570					575	
25	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
				580					585					590		
30	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
			595					600					605			
35	Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
		610					615					620				
40	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp
	625					630				635						640
45	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser
				645						650					655	
50	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			660						665					670		
55	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp
			675					680					685			
60	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly
		690					695					700				
65	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val
	705					710					715					720
70	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys				
					725					730						
	<210> 280															
	<211> 272															
75	<212> PRT															

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cuarta Cadena Polipeptídica de DART G

5

<400> 280

ES 2 898 958 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			35					40					45				
15	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50						55					60					
20	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70					75					80	
25	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		
30	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
				100					105					110			
35	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	
			115					120					125				
40	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
	130						135					140					
45	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	
	145					150					155					160	
50	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	
					165					170					175		
55	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	
				180					185					190			
60	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	
			195					200					205				
65	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	
	210						215					220					

	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	225		230		235				240
5	Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu		245		250				255	
10	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu		260		265				270	
15	<210> 281																								
	<211> 503																								
	<212> PRT																								
	<213> Secuencia artificial																								
20	<220>																								
	<223> Primera Cadena Polipeptídica de DART H																								
	<400> 281																								
25	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	1		5		10			15	
30	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr		20		25			30		
35	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro		35		40			45		
40	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	50		55		60				
45	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	65		70		75		80		
50	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys		85		90			95		
55	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly		100		105			110		
60	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala		115		120			125		
65	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser		130		135			140		
	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	145		150		155			160	

ES 2 898 958 T3

	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu
					165					170					175	
5	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp
				180					185					190		
10	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu
			195					200					205			
15	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr
	210						215					220				
20	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly
	225					230					235					240
25	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala
					245					250					255	
30	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu
				260				265						270		
35	Lys	Gly	Gly	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			275					280					285			
40	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
	290						295					300				
45	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
	305					310					315					320
50	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
				325						330					335	
55	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
				340					345					350		
60	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
			355					360					365			
65	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
	370						375					380				
70	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	385					390					395					400
75	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
				405						410					415	

ES 2 898 958 T3

	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
				420					425					430			
5	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
			435					440					445				
10	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			450				455					460					
15	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
	465					470					475					480	
20	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
					485					490					495		
25	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
					500												
30	<210> 282																
	<211> 273																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
35	<220>																
	<223> Segunda Cadena Polipeptídica de DART H																
	<400> 282																
35	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
40	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30			
45	Asp	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	
			35					40					45				
50	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
55	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65					70					75				80		
60	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	
					85					90					95		
65	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110			

ES 2 898 958 T3

	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	
			115					120					125				
5	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	
		130					135					140					
10	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	
	145					150					155					160	
15	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	
					165					170					175		
20	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	
				180					185					190			
25	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	
			195					200					205				
30	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	
	210					215						220					
35	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	
	225					230					235					240	
40	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	
					245					250					255		
45	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	
				260				265					270				
50	Glu																
	<210>	283															
	<211>	227															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
55	<220>																
	<223>	Tercera Cadena Polipeptídica de DART H															
60	<400>	283															
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
65	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
				20					25					30			

ES 2 898 958 T3

	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			35					40					45			
5	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		50					55					60				
10	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	65					70					75					80
15	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
					85					90					95	
20	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				100					105					110		
25	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			115					120					125			
30	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
		130					135					140				
35	Leu	Ser	Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
	145					150					155					160
40	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
					165					170					175	
45	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
				180					185					190		
50	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
			195					200					205			
55	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
		210					215					220				
60	Pro	Gly	Lys													
	225															
65	<210>	284														
	<211>	563														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia artificial														
	<220>															
	<223>	Primera y Tercera Cadenas Polipeptídicas de DART 1														

<400> 284

5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

ES 2 898 958 T3

	1			5						10					15	
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr
				20					25					30		
10	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
15	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55					60				
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro
	65					70					75					80
25	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Leu
					85					90					95	
30	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Asn	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				100					105					110		
35	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln
			115					120					125			
40	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Asp	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe
		130					135					140				
45	Ser	Asn	Ser	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	145					150					155					160
50	Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Ala
					165					170					175	
55	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn
				180					185					190		
60	Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			195					200					205			
65	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Asn	Asp	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
	210						215					220				
70	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
	225					230					235					240
75	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
					245					250					255	

ES 2 898 958 T3

	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
				260					265					270			
5	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
			275					280					285				
10	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
		290					295					300					
15	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
	305					310					315					320	
20	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
					325					330					335		
25	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	
				340					345					350			
30	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
			355					360					365				
35	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
		370					375					380					
40	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
	385					390					395					400	
45	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
				405						410					415		
50	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
				420					425					430			
55	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
			435					440					445				
60	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
	450						455					460					
65	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
	465					470					475					480	
70	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
					485					490					495		
75	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	
			500						505					510			

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
515 520 525

5

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
530 535 540

10

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
545 550 555 560

15

Ser Pro Gly

<210> 285
<211> 348
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Segunda y Cuarta Cadenas Polipeptídicas de DART 1

25

<400> 285

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

30

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

35

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

40

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

50

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

55

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

60

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
115 120 125

65

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
130 135 140

ES 2 898 958 T3

	Ser Asp Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu	145	150	155	160
5	Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro	165	170	175	
10	Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln	180	185	190	
15	Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr	195	200	205	
20	Tyr Cys Ala Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro	210	215	220	
25	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Leu Gly Gly Gly Ser	225	230	235	240
30	Gly Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	245	250	255	
35	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	260	265	270	
40	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	275	280	285	
45	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	290	295	300	
50	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	305	310	315	320
55	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	325	330	335	
60	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	340	345		
65	<210> 286 <211> 448 <212> PRT <213> Secuencia artificial				
	<220> <223> Primera Cadena Polipeptídica de BSAB A				
	<400> 286				
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala				

ES 2 898 958 T3

	1			5						10					15		
5	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr	
				20					25					30			
10	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
			35					40					45				
15	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	Gln	Lys	Phe	
	50						55					60					
20	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
35	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
			115					120					125				
40	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
		130					135					140					
45	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
50	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
					165					170					175		
55	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
				180					185					190			
60	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
			195					200					205				
65	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Glu	Lys	
		210					215					220					
70	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Glu	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	
	225					230					235					240	
75	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
					245					250					255		

5 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

10 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

15 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

20 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

25 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

30 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

35 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

40 Cys Glu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

45 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

50 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

55 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

60 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 287
<211> 218
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Segunda Cadena Polipeptídica de BSAB A

<400> 287

ES 2 898 958 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			35					40					45				
15	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50						55					60					
20	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70					75					80	
25	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		
30	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	
				100					105					110			
35	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	
			115					120					125				
40	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	
	130						135					140					
45	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	
	145					150					155					160	
50	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	
				165						170					175		
55	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	
				180					185					190			
60	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	
			195					200					205				
65	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys							
	210						215										

<210> 288
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Tercera Cadena Polipeptídica de BSAB A

<400> 288

5

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	

ES 2 898 958 T3

	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	
				20					25					30			
5	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
10	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Ser	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	
		50					55					60					
15	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Met	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
20	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
25	Ala	Arg	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
				100					105					110			
30	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
			115					120					125				
35	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
		130					135					140					
40	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
	145					150					155					160	
45	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
					165					170					175		
50	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
				180					185					190			
55	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
			195					200					205				
60	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Arg	
		210					215					220					
65	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	
	225					230					235					240	
70	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245						250					255		
75	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	

ES 2 898 958 T3

	260	265	270	
5	Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 275 280 285			
10	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 290 295 300			
15	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 305 310 315 320			
20	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 325 330 335			
25	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 340 345 350			
30	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 355 360 365			
35	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 370 375 380			
40	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 385 390 395 400			
45	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp 405 410 415			
50	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 420 425 430			
55	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 435 440 445			
60	Gly			
65	<210> 289 <211> 219 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> Cuarta Cadena Polipeptídica de BSAB A <400> 289			
	Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly 1 5 10 15			

ES 2 898 958 T3

	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser	
				20					25					30			
5	Asp	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	
			35					40					45				
10	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Glu	Leu	Asp	Ser	Gly	Val	Pro	
		50					55					60					
15	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
	65					70					75					80	
20	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Trp	Gln	Gly	
				85						90					95		
25	Thr	His	Phe	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
				100					105					110			
30	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
			115					120					125				
35	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
		130					135					140					
40	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
	145					150					155					160	
45	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
				165						170					175		
50	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
				180					185					190			
55	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
		195						200					205				
60	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
		210					215										
65	<210>	290															
	<211>	496															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
60	<220>																
	<223>	Primera y Tercera Cadenas Polipeptídicas de DART I															
65	<400>	290															

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Ser	Val
				20					25				30			
10	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
15	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
	50						55					60				
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
25	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp
					85					90					95	
30	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				100					105					110		
35	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			115					120					125			
40	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe
	130						135					140				
45	Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	145					150					155					160
50	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp
					165					170					175	
55	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser
				180					185					190		
60	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			195					200					205			
65	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp
	210						215					220				
70	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly
	225					230					235					240
75	Glu	Val	Ala	Ala	Cys	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val
					245					250					255	

ES 2 898 958 T3

	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Ser	Lys	Tyr	
				260					265					270			
5	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	
			275					280					285				
10	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	
		290					295					300					
15	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	
	305					310					315					320	
20	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
					325					330					335		
25	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
				340					345					350			
30	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	
			355					360					365				
35	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	
		370					375					380					
40	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	
	385					390					395					400	
45	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	
				405						410					415		
50	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	
				420					425					430			
55	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	
			435					440					445				
60	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
		450					455					460					
65	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	
	465					470					475					480	
70	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	
					485					490						495	
75	<210>	291															
80	<211>	271															

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Segunda y Cuarta Cadenas Polipeptídicas de DART I

<400> 291

ES 2 898 958 T3

	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	
				20					25					30			
10	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	
			35					40					45				
15	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50						55					60					
20	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70					75					80	
25	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		
30	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
				100					105					110			
35	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	
			115					120					125				
40	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
		130					135					140					
45	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Asn	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	
	145					150					155					160	
50	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Asp	Ile	Asn	Pro	Asp	Asn	Gly	Val	
					165					170					175		
55	Thr	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Glu	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	
				180					185					190			
60	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	
			195					200					205				
65	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Phe	
		210					215					220					

ES 2 898 958 T3

	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	225	230	235	240
5	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Cys	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	245	250	255	
10	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu		260	265	270	
15	<210> 292																			
	<211> 566																			
	<212> PRT																			
	<213> Secuencia artificial																			
20	<220>																			
	<223> Primera y Tercera Cadenas Polipeptídicas de DART J																			
	<400> 292																			
25	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
30	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Ser	Val	20	25	30	
35	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
40	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
45	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
50	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	85	90	95	
55	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	100	105	110	
60	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	115	120	125	
65	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	130	135	140	
	Thr	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	145	150	155	160

ES 2 898 958 T3

	Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	His	Pro	Ser	Asp	Ser	Glu	Thr	Trp	Leu	Asp	
				165						170					175		
5	Gln	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	
				180					185					190			
10	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	
			195					200					205				
15	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	Pro	Phe	Ala	Tyr	Trp	
		210					215					220					
20	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
	225					230					235					240	
25	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	
					245					250					255		
30	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
				260					265					270			
35	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			275					280					285				
40	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
		290					295					300					
45	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	
	305					310					315					320	
50	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				325						330					335		
55	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
				340					345					350			
60	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
		355						360					365				
65	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
		370					375					380					
70	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
	385					390					395					400	
75	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
				405						410					415		

	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
				420					425					430		
5	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
			435					440					445			
10	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
		450					455					460				
15	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
	465					470					475					480
20	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
					485					490					495	
25	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				500					505					510		
30	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
			515					520					525			
35	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
		530					535					540				
40	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
	545					550				555						560
45	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly										
					565											
	<210> 293															
	<211> 350															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
	<223> Segunda y Cuarta Cadenas Polipeptídicas de DART J															
50	<400> 293															
	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
	1				5					10					15	
55	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr
				20					25					30		
60	Gly	Met	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
		35						40					45			
65																

ES 2 898 958 T3

	Lys	Leu	Leu	Ile	His	Ala	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
	50						55					60					
5	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
	65					70					75					80	
10	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys	
					85					90					95		
15	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
				100					105					110			
20	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	
			115					120					125				
25	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	
		130					135					140					
30	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Asn	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	
	145					150					155					160	
35	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Asp	Ile	Asn	Pro	Asp	Asn	Gly	Val	
				165						170					175		
40	Thr	Ile	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Glu	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	
			180						185					190			
45	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	
		195						200					205				
50	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Phe	
	210						215					220					
55	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly	
	225					230					235				240		
60	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	
				245						250					255		
65	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	
			260						265					270			
70	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	
		275						280					285				
75	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	
	290						295					300					

ES 2 898 958 T3

	Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala	
	305	310 315 320
5	Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly	
		325 330 335
10	Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
		340 345 350
	<210> 294	
	<211> 118	
15	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Dominio VH de hLAG-3 mAb 6 VH1	
20	<400> 294	
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala	
25	1	5 10 15
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
30		20 25 30
	Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35		35 40 45
	Gly Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe	
40		50 55 60
	Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
45		65 70 75 80
	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
50		85 90 95
	Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
55		100 105 110
	Thr Leu Thr Val Ser Ser	
60		115
	<210> 295	
	<211> 118	
65	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Dominio VH de hLAG-3 mAb 6 VH2	

ES 2 898 958 T3

<400> 295

5	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	1 5 10 15
10	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr	20 25 30
15	Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	35 40 45
20	Ser Asp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Val Thr Ile Tyr Asn Gln Lys Phe	50 55 60
25	Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr	65 70 75 80
30	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85 90 95
35	Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	100 105 110
40	Thr Leu Thr Val Ser Ser	115

<210> 296

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio VL de hLAG-3 mAb 6 VL1

<400> 296

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	
	1				5					10					15		
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Ser	Val	
				20					25					30			
10	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	
			35					40					45				
15	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	
	50						55					60					
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	
	65					70					75					80	
25	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	
					85					90					95		
30	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys						
				100					105								
	<210> 297																
	<211> 107																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia artificial																
35	<220>																
	<223> Dominio VL de hLAG-3 mAb 6 VL2																
40	<400> 297																

ES 2 898 958 T3

	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5					10					15	
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Ser	Val
				20					25					30		
10	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
15	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
25	Glu	Asp	Ile	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	His	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp
					85					90					95	
30	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys					
				100					105							
	<210> 298															
	<211> 11															
	<212> PRT															
35	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
	<223> CDRL1 del Dominio VL de hLAG-3 mAb 6 VL1 y VL2															
40	<400> 298															
	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Ser	Val	Val	Ala					
	1				5						10					

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana que comprende un dominio de cadena pesada variable y un dominio de cadena ligera variable, en donde: dicho dominio de cadena pesada variable comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 147**, y dicho dominio de cadena ligera variable comprende la secuencia de aminoácidos de la **SEQ ID NO: 153**.
- 10 2. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 1, en donde dicha molécula es una molécula de unión biespecífica, capaz de unirse simultáneamente a PD-1 humana y a un segundo epítipo.
- 15 3. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 2, en la que dicho segundo epítipo es un epítipo de una molécula implicada en la regulación de un punto de control inmunitario presente en la superficie de una célula inmunitaria, en donde dicho segundo epítipo es un epítipo de B7-H3, B7-H4, BTLA, CD40, CD40L, CD47, CD70, CD80, CD86, CD94, CD137, CD137L, CD226, CTLA-4, Galectina-9, GITR, GITRL, HHLA2, ICOS, ICOSL, KIR, LAG-3, LIGHT, MHC clase I o II, NKG2a, NKG2d, OX40, OX40L, PD1H, PD-1, PD-L1, PD-L2, PVR, SIRPa, TCR, TIGIT, TIM-3 o VISTA
- 20 4. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 3, en la que dicho segundo epítipo es un epítipo de LAG-3.
- 25 5. La Molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 4, en la que dicho sitio de unión al epítipo de LAG-3 comprende:
- (A)
- (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de LAG-3 mAb 1, y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 42**, **SEQ ID NO: 43** y **SEQ ID NO: 44**; y
- 30 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de LAG-3 mAb 1, y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 46**, **SEQ ID NO: 47** y **SEQ ID NO: 48**;
- o
- 35 (B)
- (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de hLAG-3 mAb 1 VH1, y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 42**, **SEQ ID NO: 43** y **SEQ ID NO: 44**; y
- 40 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de LAG-3 mAb 1 VL4, y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 55**, **SEQ ID NO: 47** y **SEQ ID NO: 48**;
- o
- 45 (C)
- (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de LAG-3 mAb 6, y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 57**, **SEQ ID NO: 58** y **SEQ ID NO: 59**; y
- 50 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de LAG-3 mAb 6, y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 61**, **SEQ ID NO: 62** y **SEQ ID NO: 63**;
- o
- 55 (D)
- (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de hLAG-3 mAb 6 VH1, y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 57**, **SEQ ID NO: 58** y **SEQ ID NO: 59**; y
- 60 (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de LAG-3 mAb 6 y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 298**, **SEQ ID NO: 62**, y **SEQ ID NO: 63**.
- 65 6. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 5, en la que dicho sitio de unión al epítipo de LAG-3 comprende:

- (1) el dominio de CDR_{H1}, el dominio de CDR_{H2} y el dominio de CDR_{H3} de la cadena pesada variable de hLAG-3 mAb 6 VH1, y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 57**, **SEQ ID NO: 58** y **SEQ ID NO: 59**; y
- (2) el dominio de CDR_{L1}, el dominio de CDR_{L2} y el dominio de CDR_{L3} de la cadena ligera variable de hLAG-3 mAb 6 VL1/VL2 y comprenden respectivamente las secuencias de aminoácidos: **SEQ ID NO: 298**, **SEQ ID NO: 62** y **SEQ ID NO: 63**.
7. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 6, en la que dicho sitio de unión al epítipo LAG-3 comprende:
- (1) la cadena pesada variable de hLAG-3 mAb 6 VH1 (**SEQ ID NO: 294**) y
- (2) la cadena ligera variable de hLAG-3 mAb 6 VL1 (**SEQ ID NO: 296**).
8. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicha molécula es:
- (A) un diacuerpo, dicho diacuerpo siendo un complejo unido covalentemente que comprende dos, tres, cuatro o cinco cadenas polipeptídicas; o
- (B) una molécula de unión trivalente, dicha molécula de unión trivalente siendo un complejo unido covalentemente que comprende tres, cuatro o cinco cadenas polipeptídicas, o
- (C) un anticuerpo biespecífico.
9. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 8, en donde dicha molécula es un diacuerpo y comprende un dominio de unión a albúmina (ABD).
10. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha molécula comprende una región Fc y en donde:
- (a) dicha región Fc es del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4;
- (b) dicha molécula comprende adicionalmente un dominio bisagra;
- (c) dicha región Fc es un Dominio Fc de IgG4 y dicho anticuerpo comprende adicionalmente un Dominio Bisagra de IgG4 que comprende una mutación estabilizadora; o
- (d) dicha región Fc comprende una o más modificaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la región Fc variante por un FcγR; y/o
- (e) dicha región Fc comprende una o más modificaciones de aminoácidos que potencian la vida media en suero de la región Fc variante.
11. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 10, en la que:
- (A) dicha una o más modificaciones que reducen la afinidad de la Región Fc variante por un FcγR, y dichas modificaciones comprenden la sustitución de L234A; L235A; o L234A y L235A, en donde dicha numeración es la del índice EU como en Kabat; y
- (B) dichas una o más modificaciones que mejoran la vida media en suero de la Región Fc variante, y dichas modificaciones que mejoran la vida media en suero de la Región Fc variante comprenden la sustitución de M252Y; M252Y y S254T; M252Y y T256E; M252Y, S254T y T256E; o K288D y H435K, en donde dicha numeración es la del índice EU como en Kabat.
12. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de cualquiera de las reivindicaciones 8, 10 u 11, en donde dicha molécula es un diacuerpo que comprende:
- (a) **SEQ ID NO: 267**, en donde X₁ es Ala; X₂ es Tyr; X₃ es Thr; X₄ es Glu y la **SEQ ID NO: 268**; o
- (b) **SEQ ID NO: 267**, en donde X₁ es Gly; X₂ es Tyr; X₃ es Thr; X₄ es Glu y la **SEQ ID NO: 268**; o
- (c) **SEQ ID NO: 267**, en donde X₁ es Gly; X₂ es Met; X₃ es Ser; X₄ es Thr, y la **SEQ ID NO: 268**; o
- (d) **SEQ ID NO: 269 y 270**; o
- (e) **SEQ ID NO: 271 y 272**; o
- (f) **SEQ ID NO: 273, 274, 275 y 276**; o
- (g) **SEQ ID NO: 277, 278, 279 y 280**; o
- (h) **SEQ ID NO: 281, 282 y 283**; o
- (i) **SEQ ID NO: 290 y 291**; o
- (j) **SEQ ID NO: 292 y 293**.
13. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de la reivindicación 12, en donde dicha molécula es un diacuerpo que comprende las **SEQ ID NO: 290 y 291**.

14. Una composición que comprende:

- (A) la molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de cualquiera de las reivindicaciones 1-13; y
- (B) un portador farmacéuticamente aceptable.

15. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o la composición de la reivindicación 14, para su uso en:

- (A) un método para estimular una respuesta inmunitaria mediada por células T de un sujeto con necesidad de ello; o
- (B) el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un sistema inmunitario deprimido.

16. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana o la composición de la reivindicación 15, para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la enfermedad o afección es cáncer o una infección, opcionalmente en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste de un tumor de la glándula suprarrenal, un cáncer asociado al SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor cerebral metastásico, un cáncer de mama, tumores del cuerpo carotídeo, un cáncer de cuello uterino, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma de células renales cromóforas, un carcinoma de células claras, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma fibroso benigno cutáneo, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ossium de fibrogénesis imperfecta, una displasia fibrosa de hueso, un cáncer de vesícula biliar o de vías biliares, un cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endocrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, un cáncer de ovario, un cáncer de páncreas, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor paratiroideo, un cáncer pediátrico, un tumor de la vaina nerviosa periférica, un feocromocitoma, un tumor pituitario, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejidos blandos, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides y un cáncer de útero, opcionalmente en donde dicho cáncer es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de recto, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda B (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas (HCL), neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas (BPDCN), linfomas no Hodgkin (NHL), incluyendo leucemia de células del manto (MCL) y linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica o linfoma de Burkitt.

17. La molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dicha molécula es para su uso en un método *in vitro* de detección de PD-1, y en donde dicha molécula o dicho anticuerpo está marcado detectablemente.

18. El uso de la molécula multiespecífica de unión a PD-1 antihumana de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en la detección *in vitro* de PD-1, en donde dicha molécula o dicho anticuerpo está marcado detectablemente.

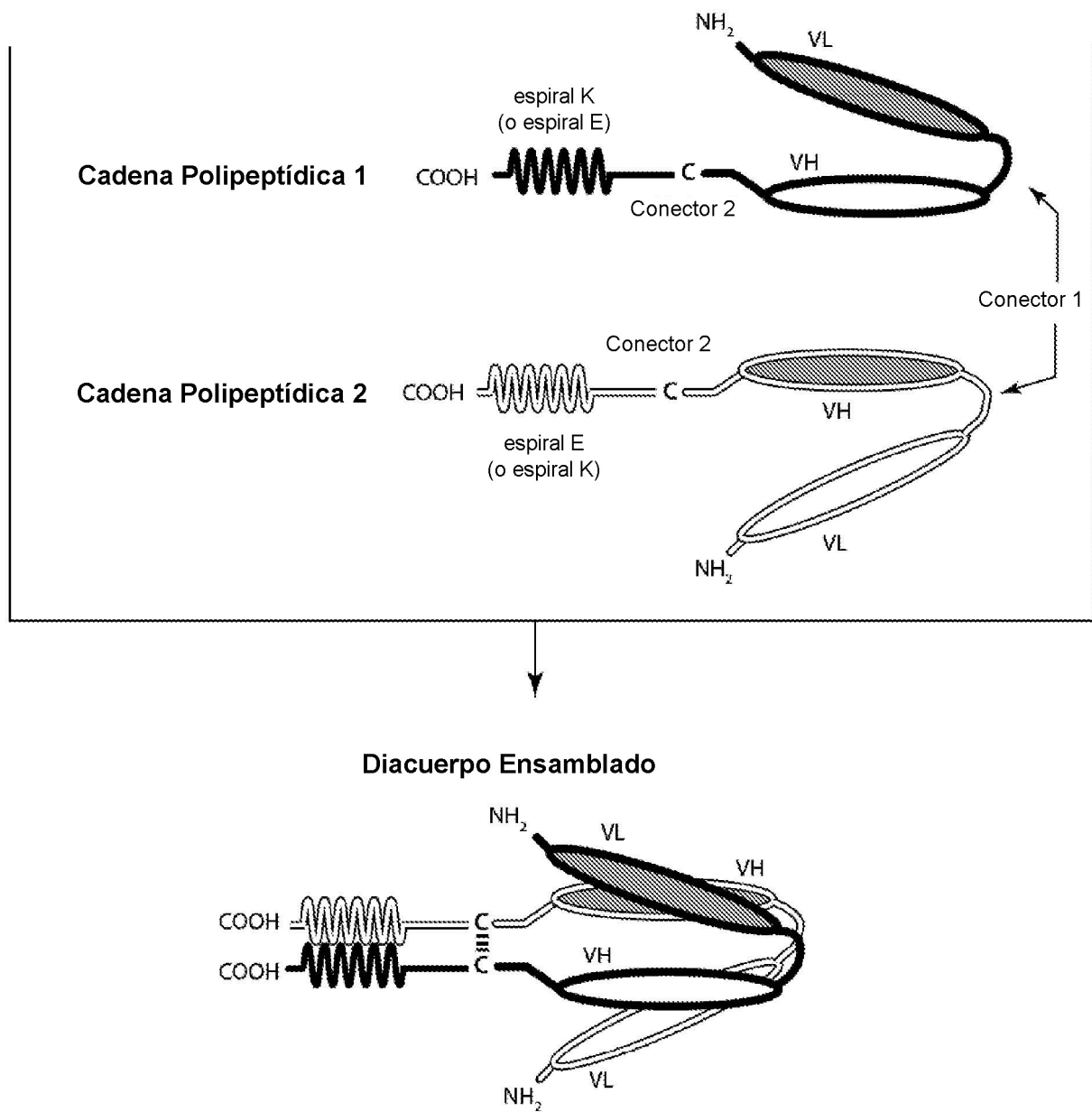


Figura 1

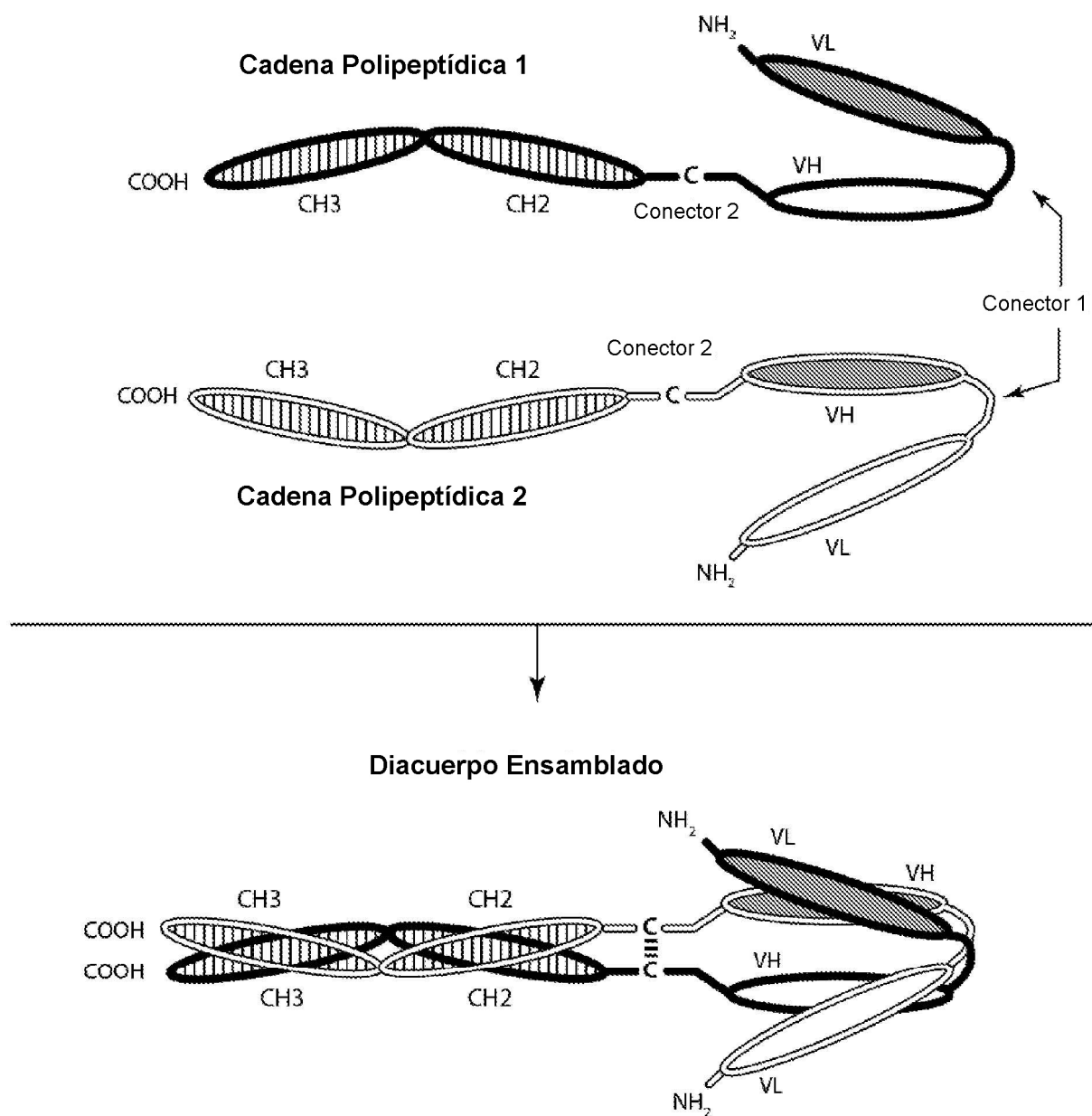


Figura 2

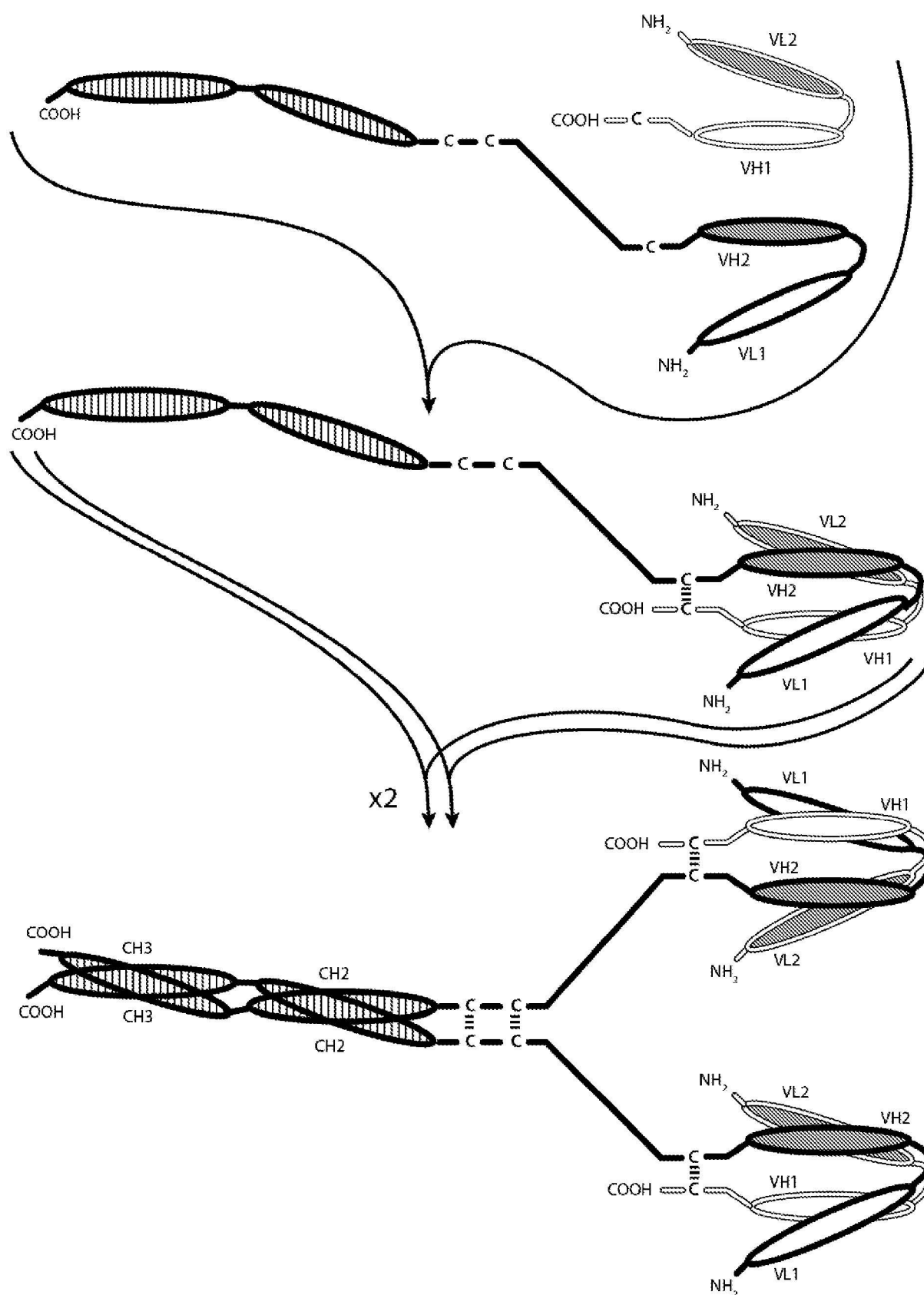


Figura 3A

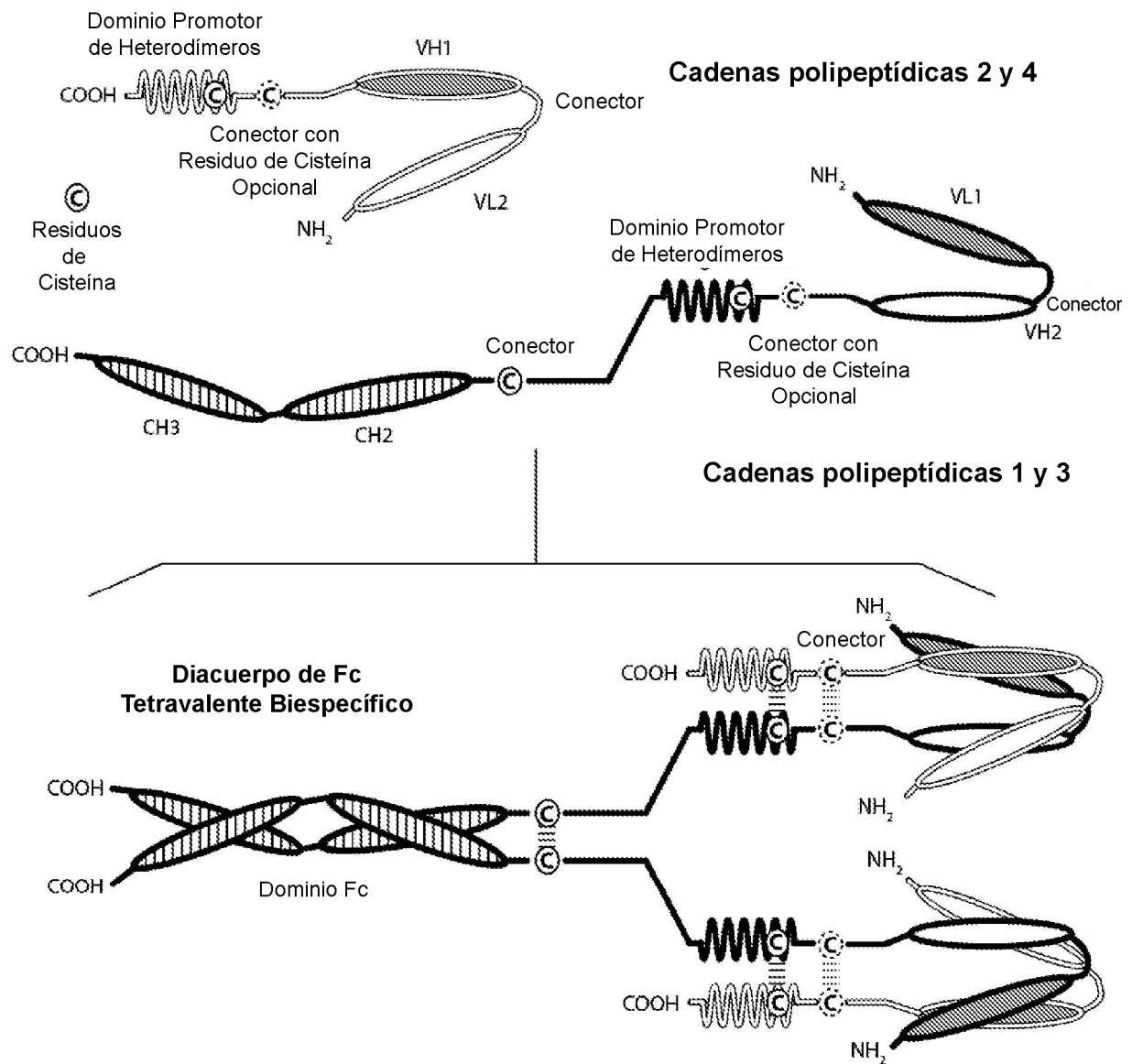


Figura 3B

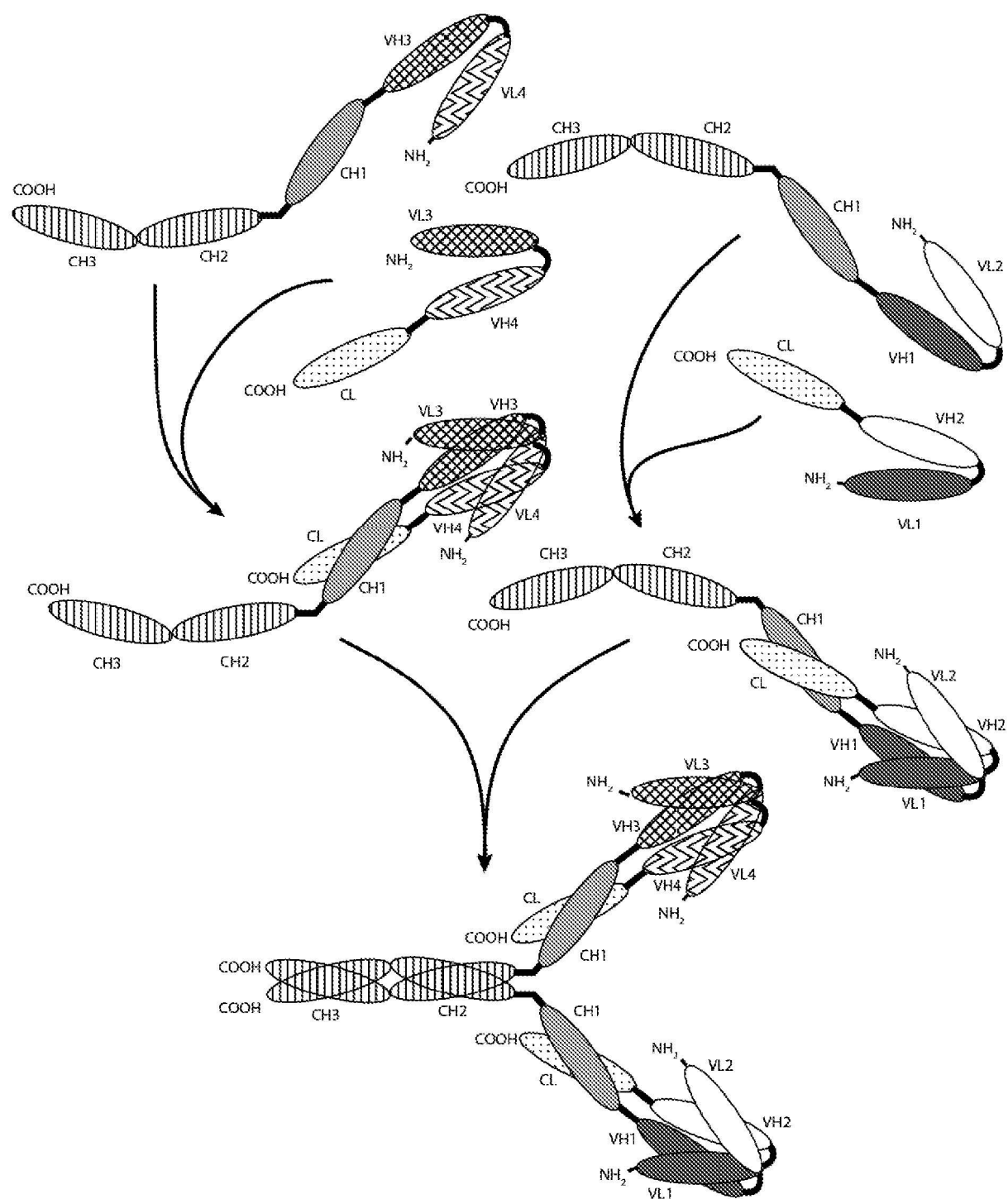


Figura 3C

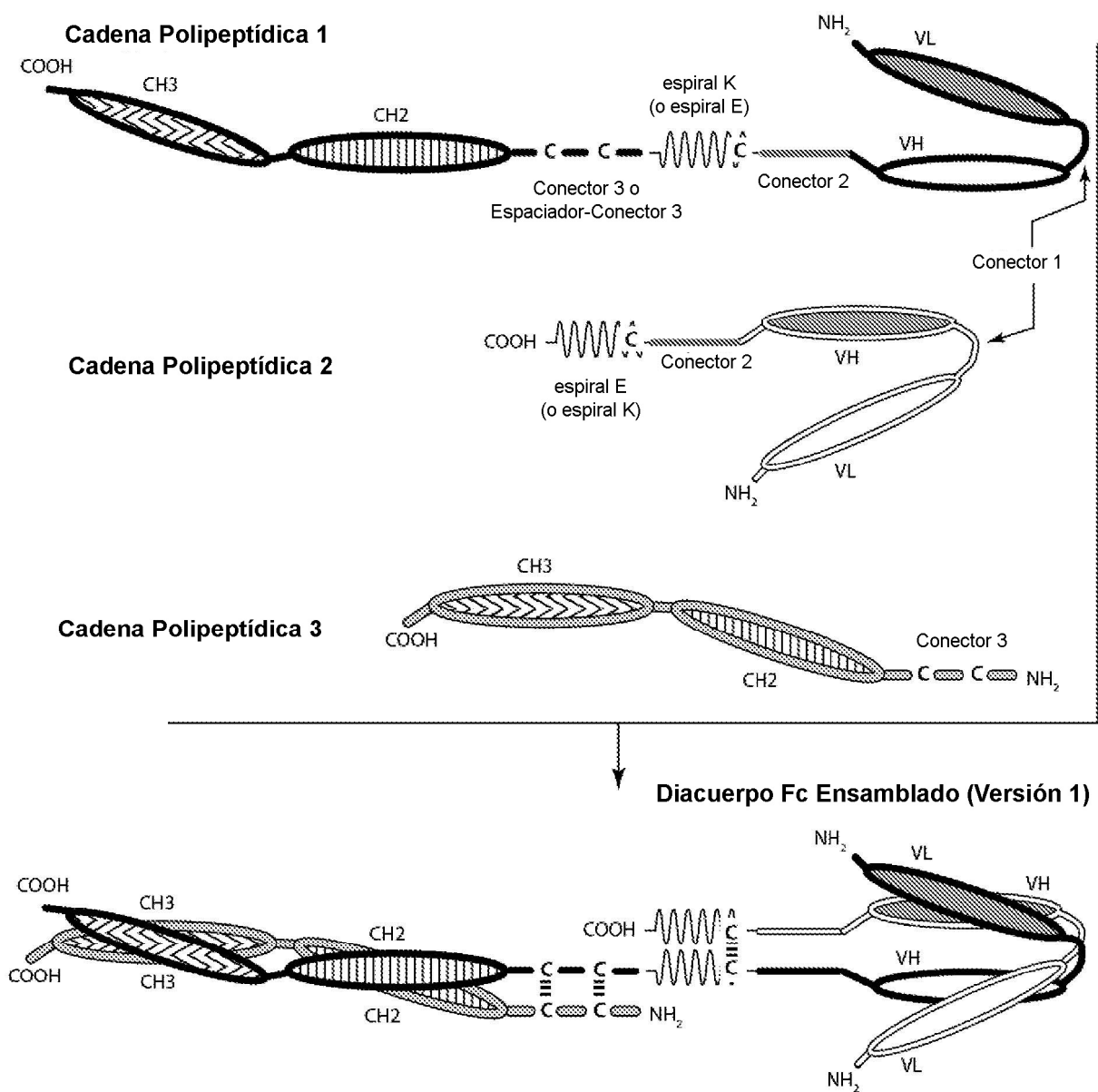


Figura 4A

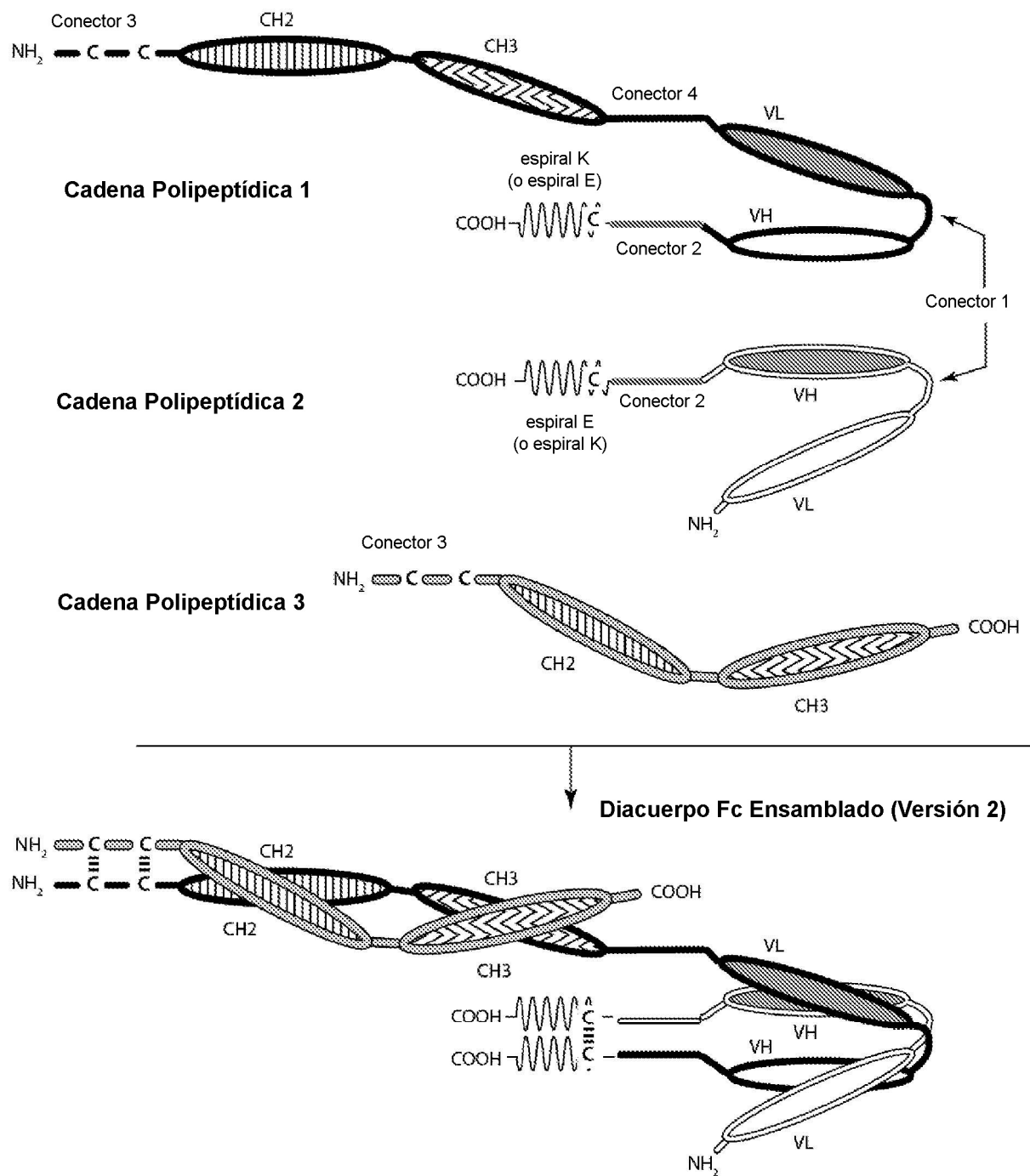


Figura 4B

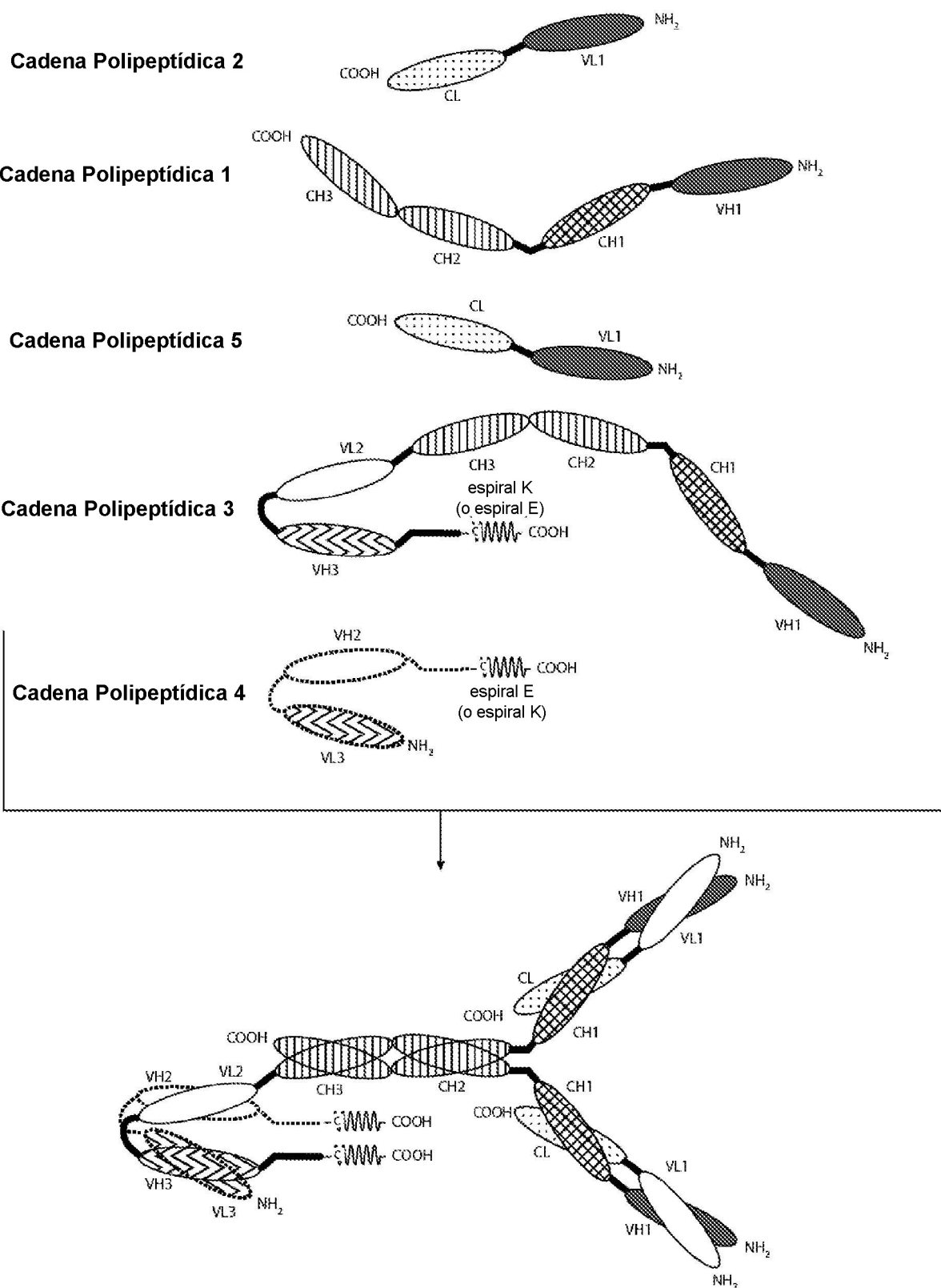


Figura 5

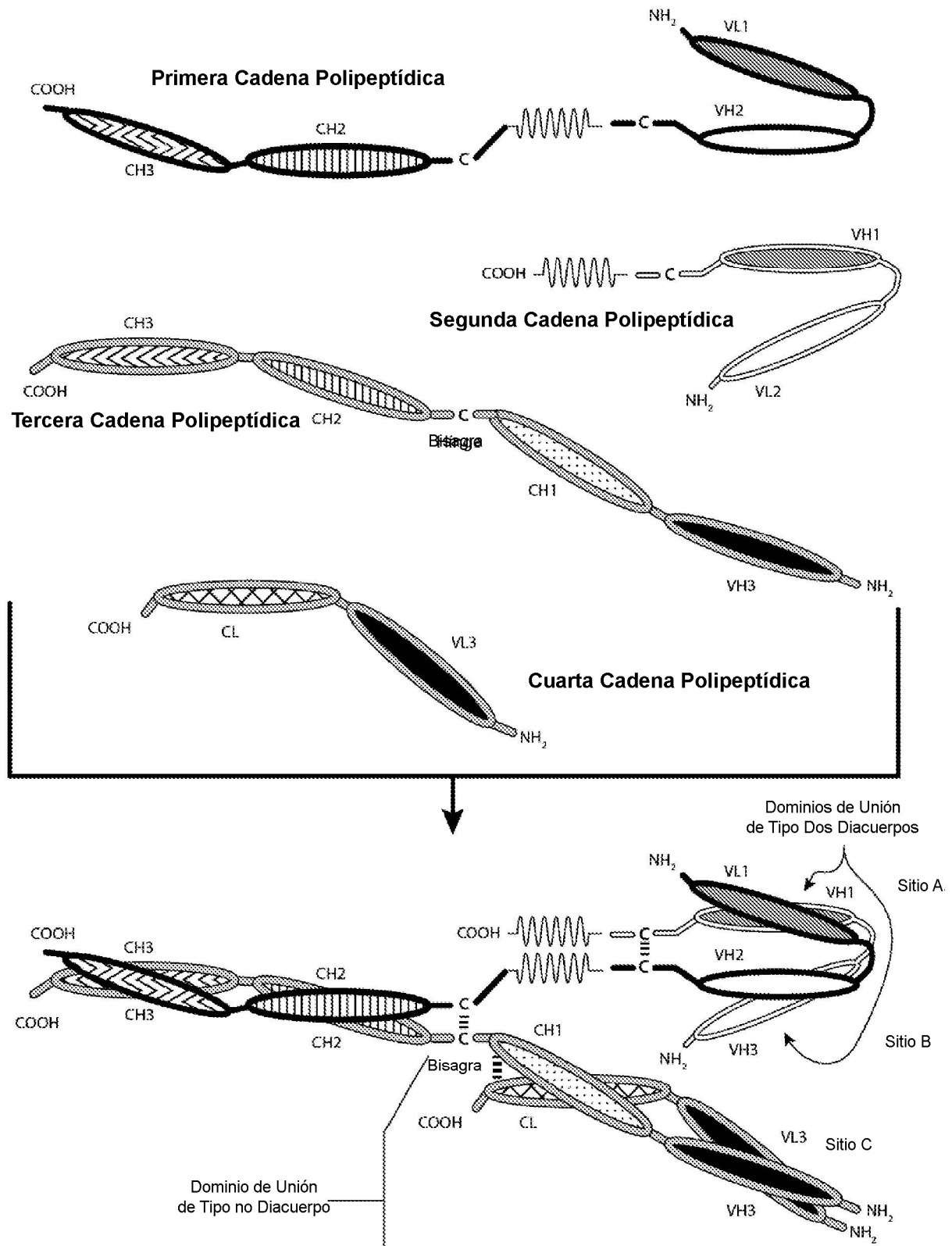


Figura 6A

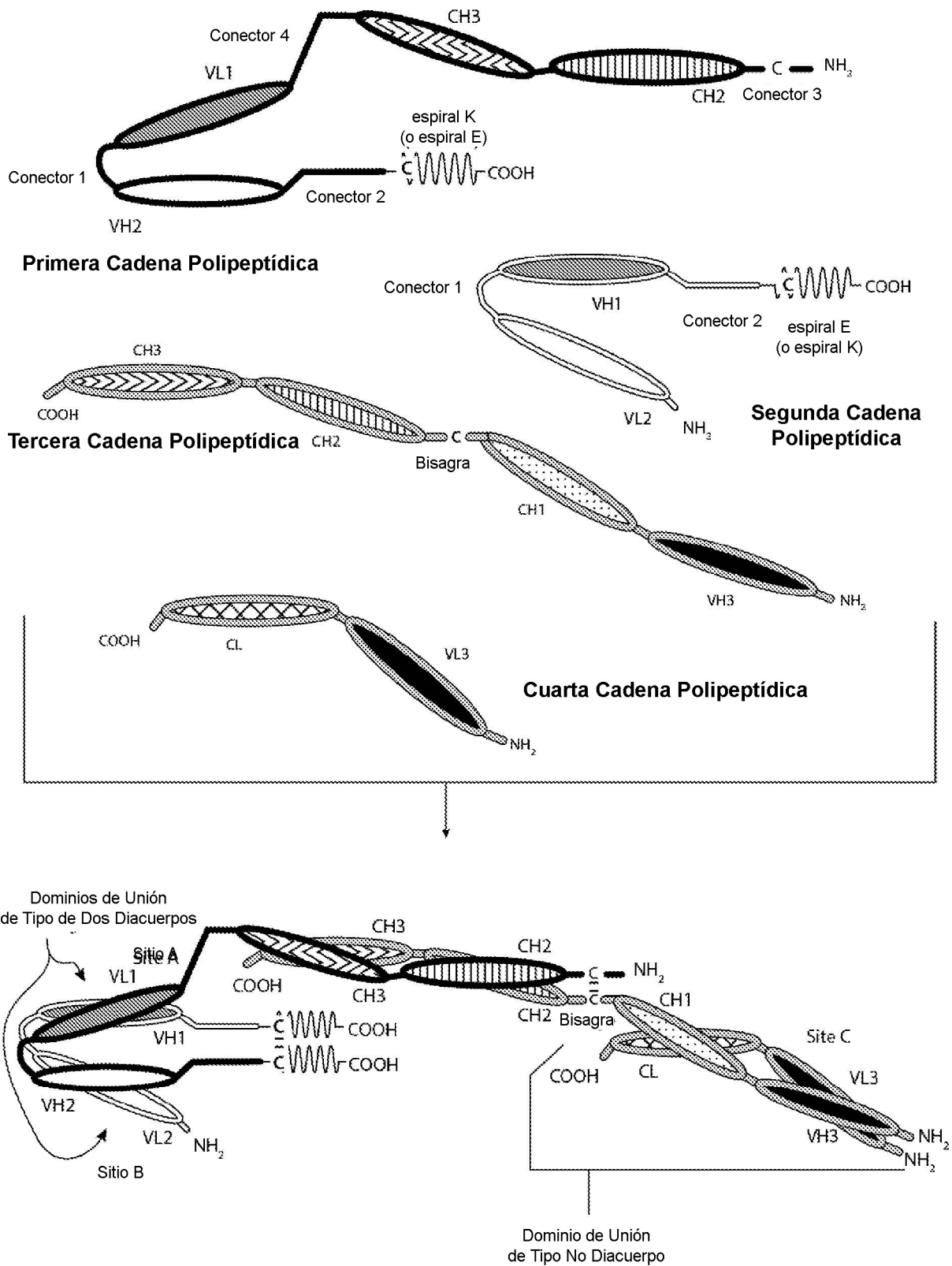


Figura 6B

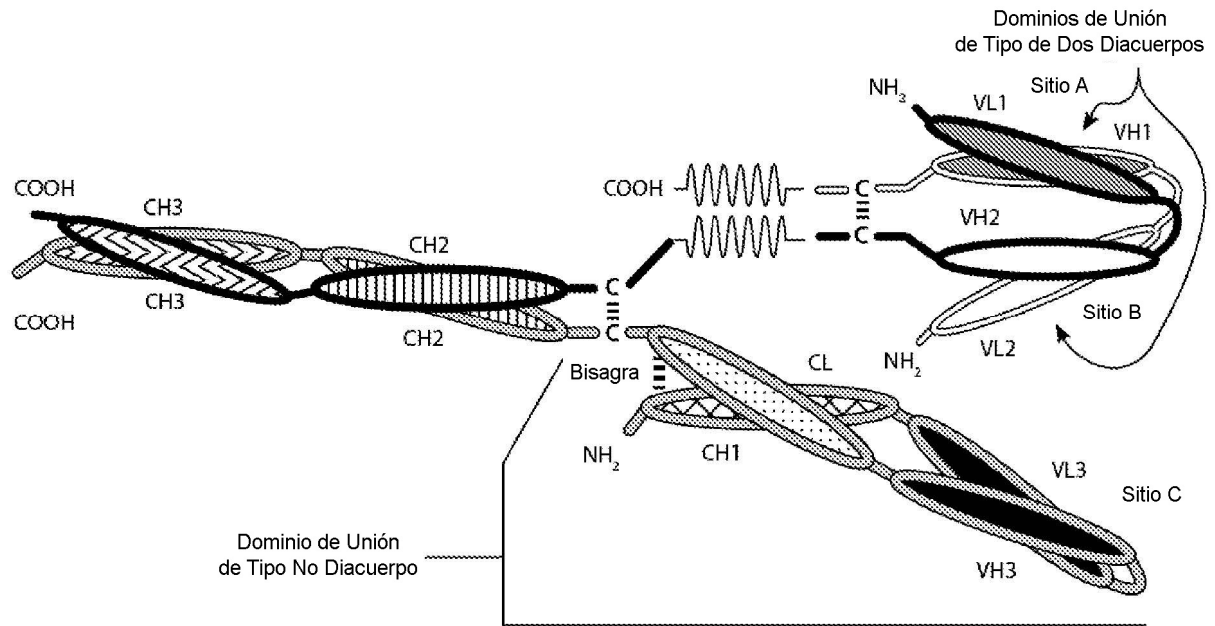


Figura 6C

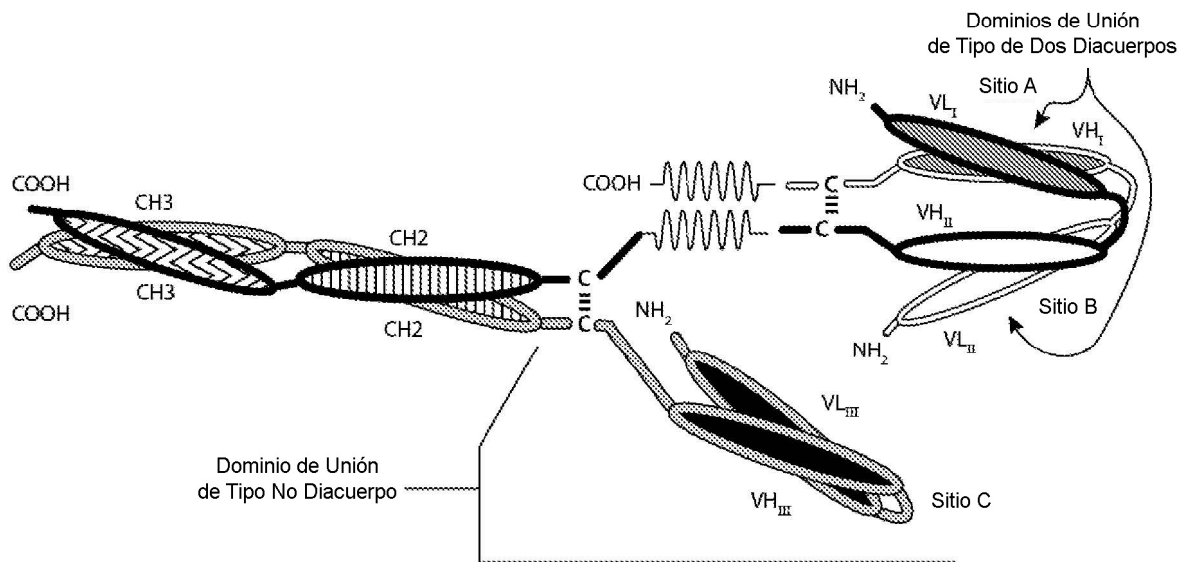


Figura 6D

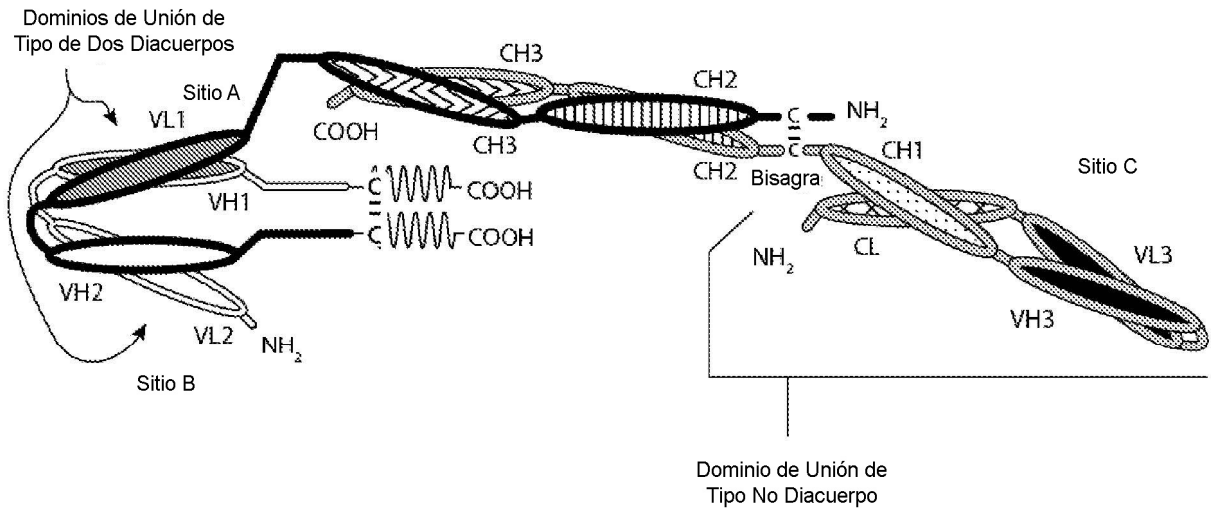


Figura 6E

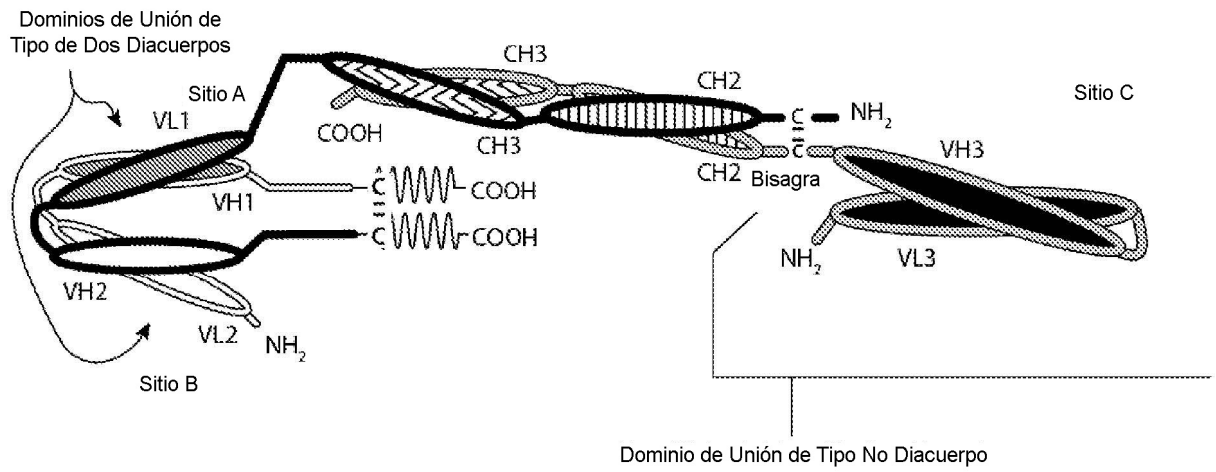


Figura 6F

shPD-1 His (1ug/ml) recubierto y G anti M H+L HRP detectado

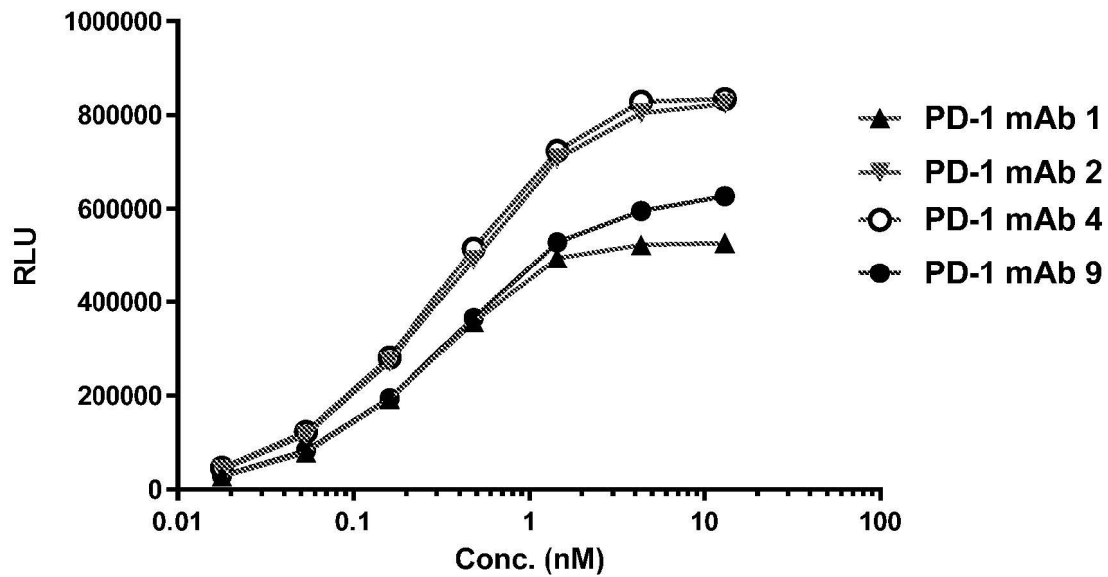


Figura 7A

shPD-1 His (0,5ug/ml) recubierto y G anti M H+L HRP detectado

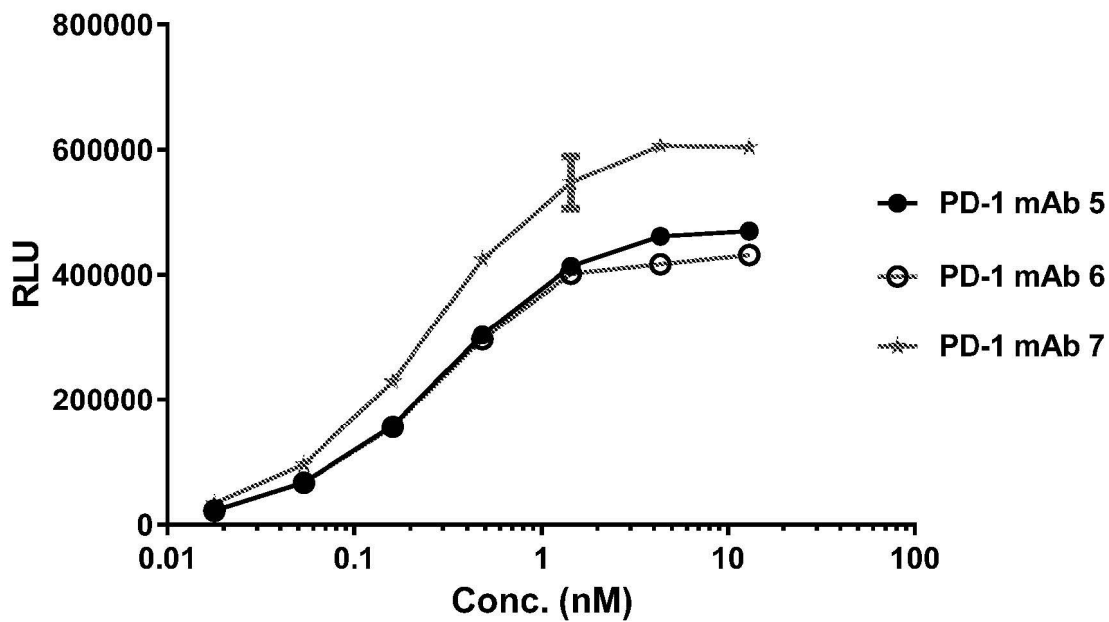


Figura 7B

shPD-1 His (0,5ug/ml) recubierto y G anti mlgG (H+L) detectado

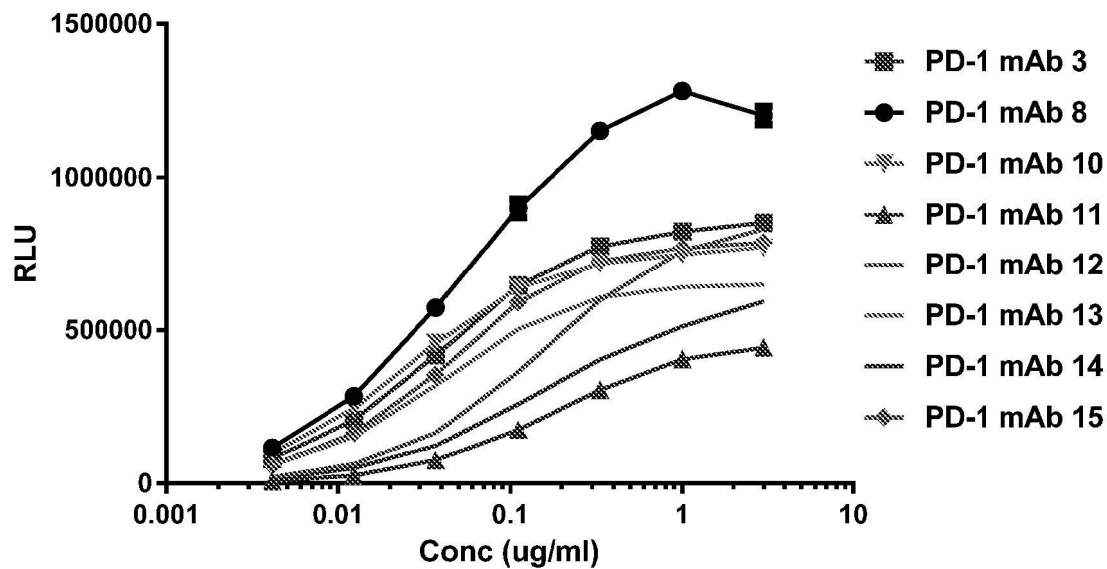


Figura 7C

shPD-1 hFc (0,5ug/ml) recubierto y G anti mlgG (H+L) detectado

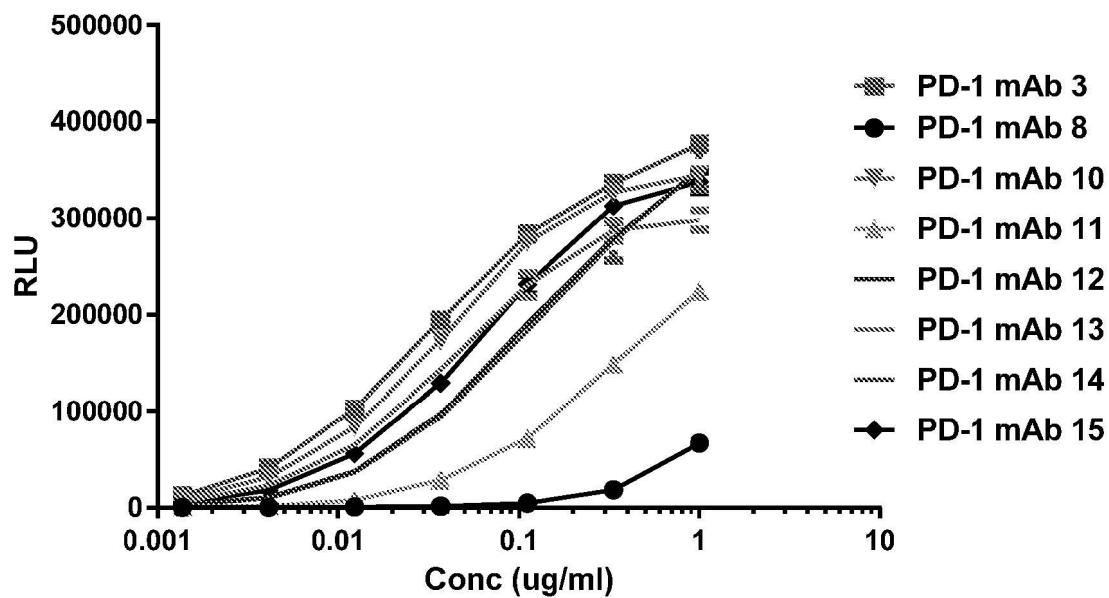


Figura 7D

scino-PD-1-TEV-Fc (0,5ug/ml) recubierto y G anti M H+L HRP detectado

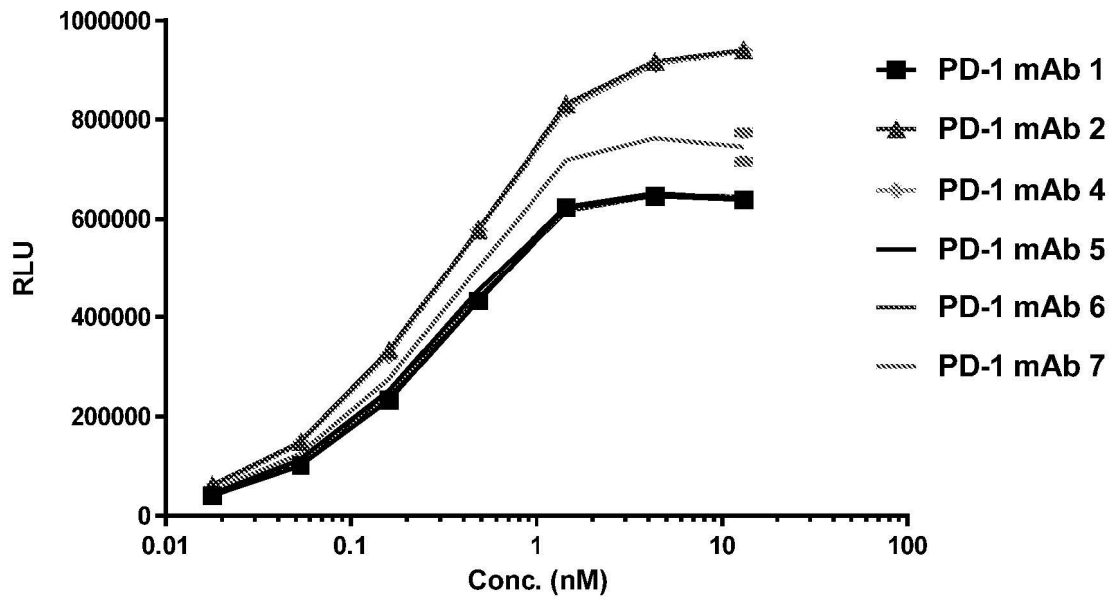


Figura 8A

scino-PD-1-TEC-hFc(1ug/ml) recubierto y G anti M (H+L) detectado

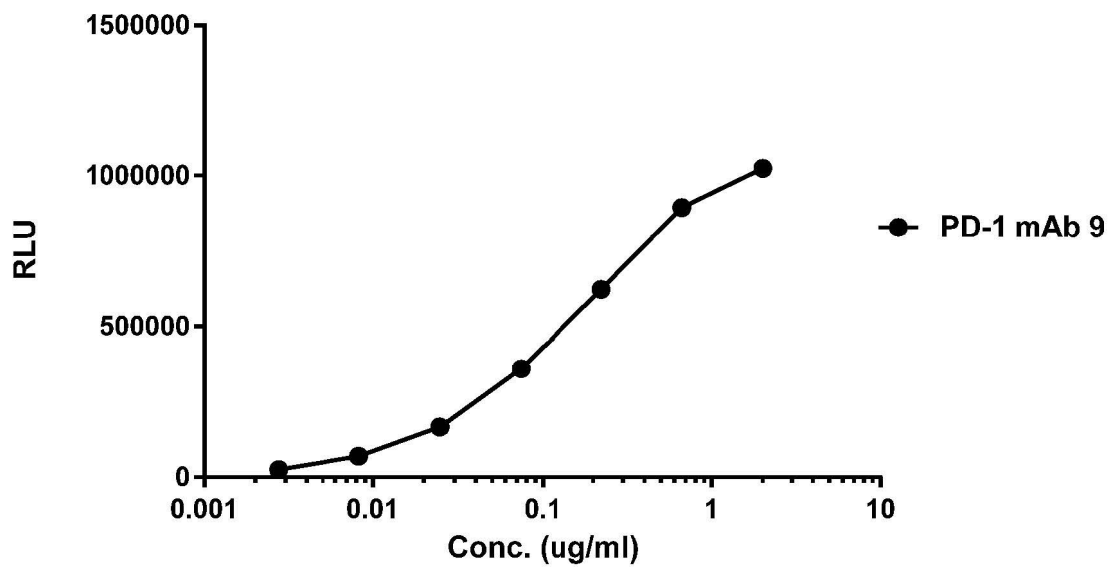


Figura 8B

scino-PD-1-TEV-Fc (1ug/ml) recubierto y G anti mlgG (H+L) detectado

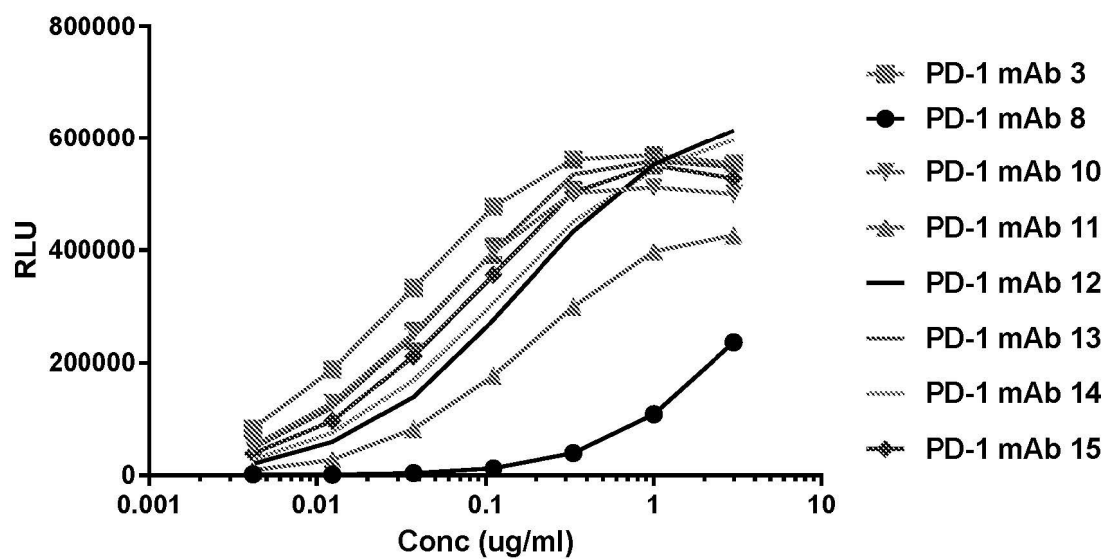


Figura 8C

PD-L1 Fc-biotina (1ug/ml) capturado y shPD-1 His detectado

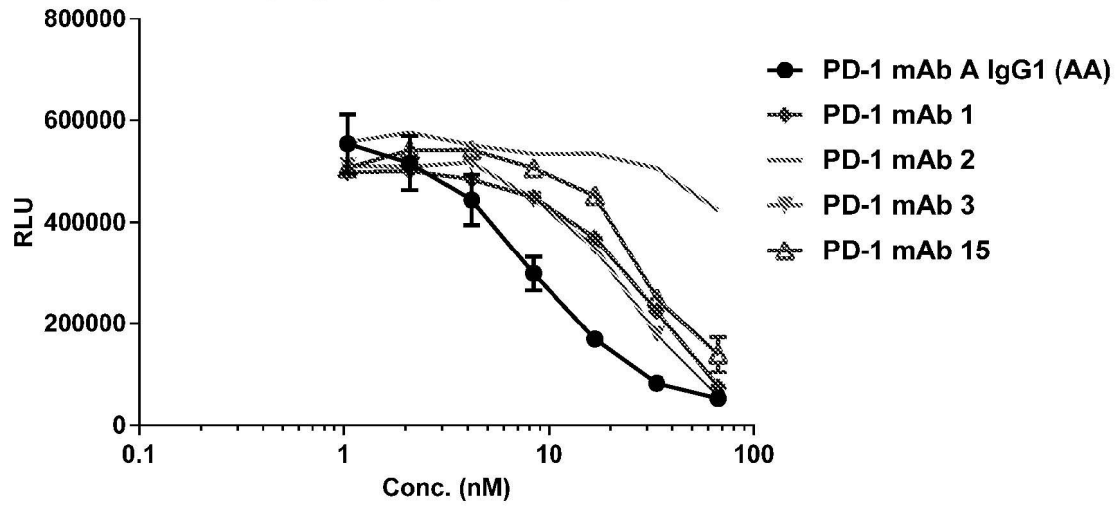


Figura 9A

PD-L1 Fc-biotina (1ug/ml) capturado y shPD-1 His detectado

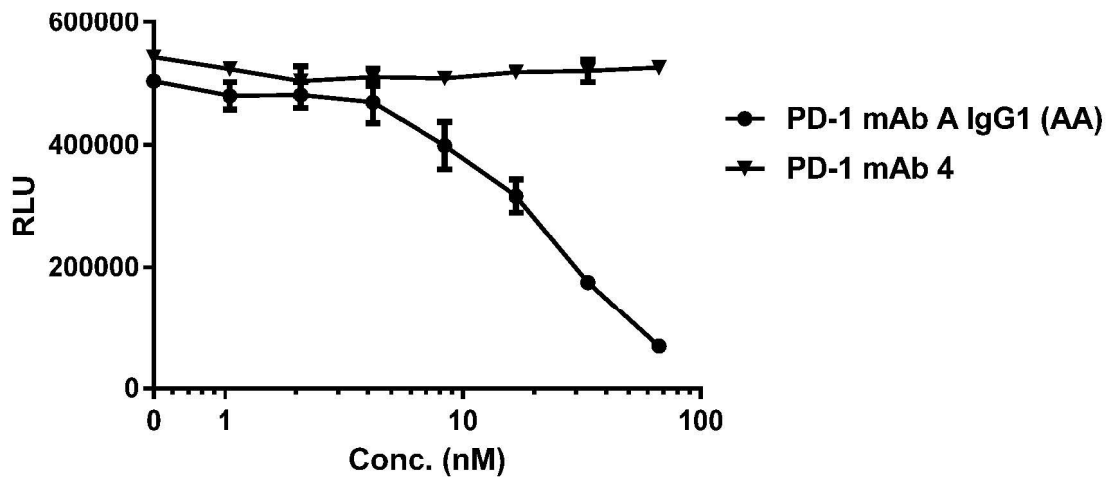


Figura 9B

PD-L1 Fc-biotina (1ug/ml) capturado y shPD-1 His detectado

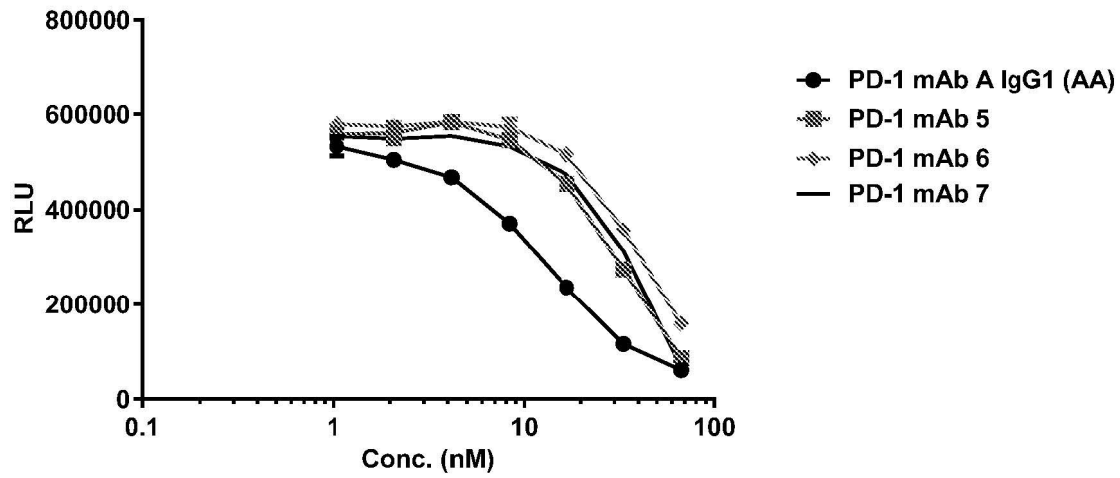


Figura 9C

PD-L1 Fc-biotina (1ug/ml) capturado y shPD-1 His detectado

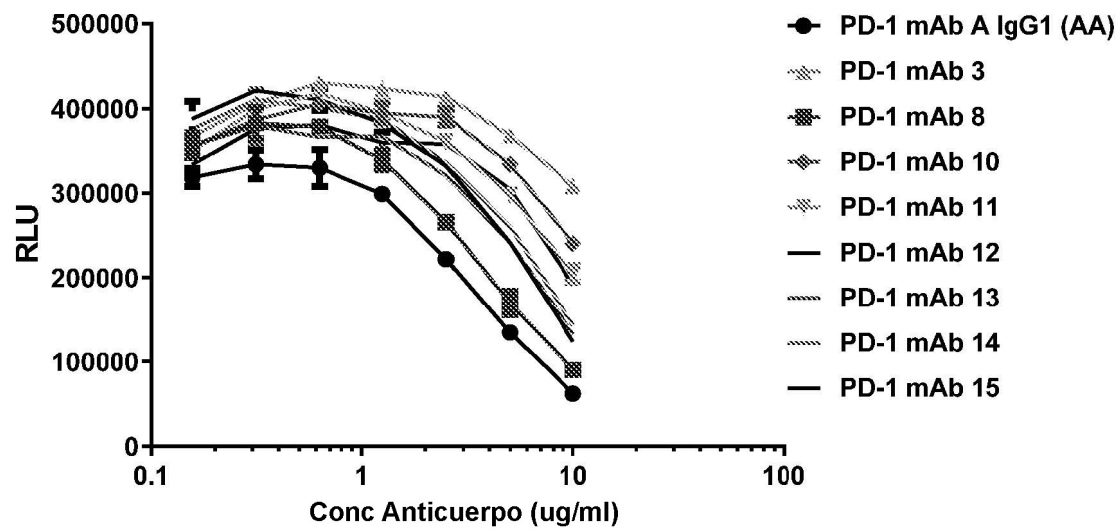
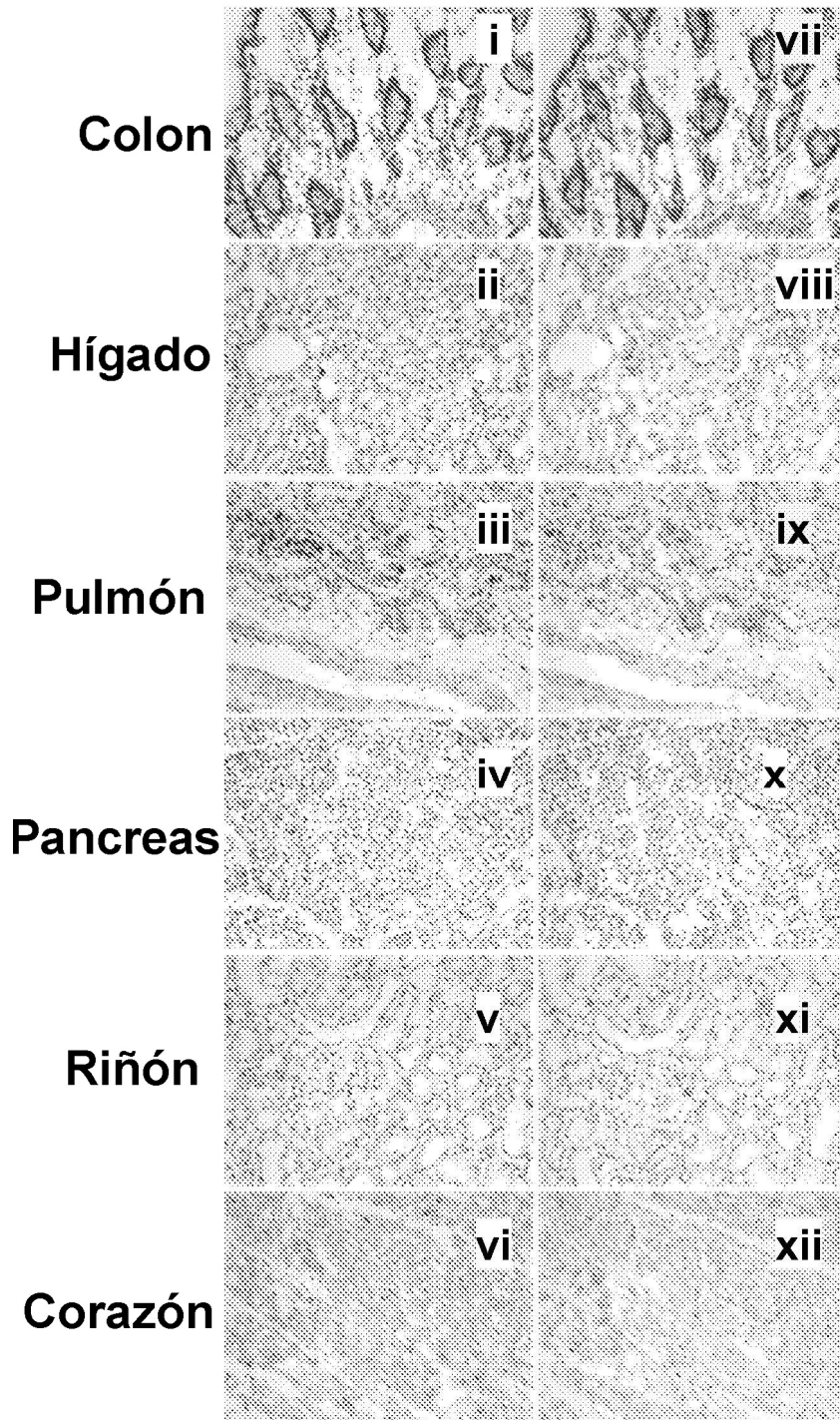


Figura 9D

Tejidos Normales



PD-1 mAb 7 Control de Isotipo
0.313 µg/ml 0.313 µg/ml

Figura 10A

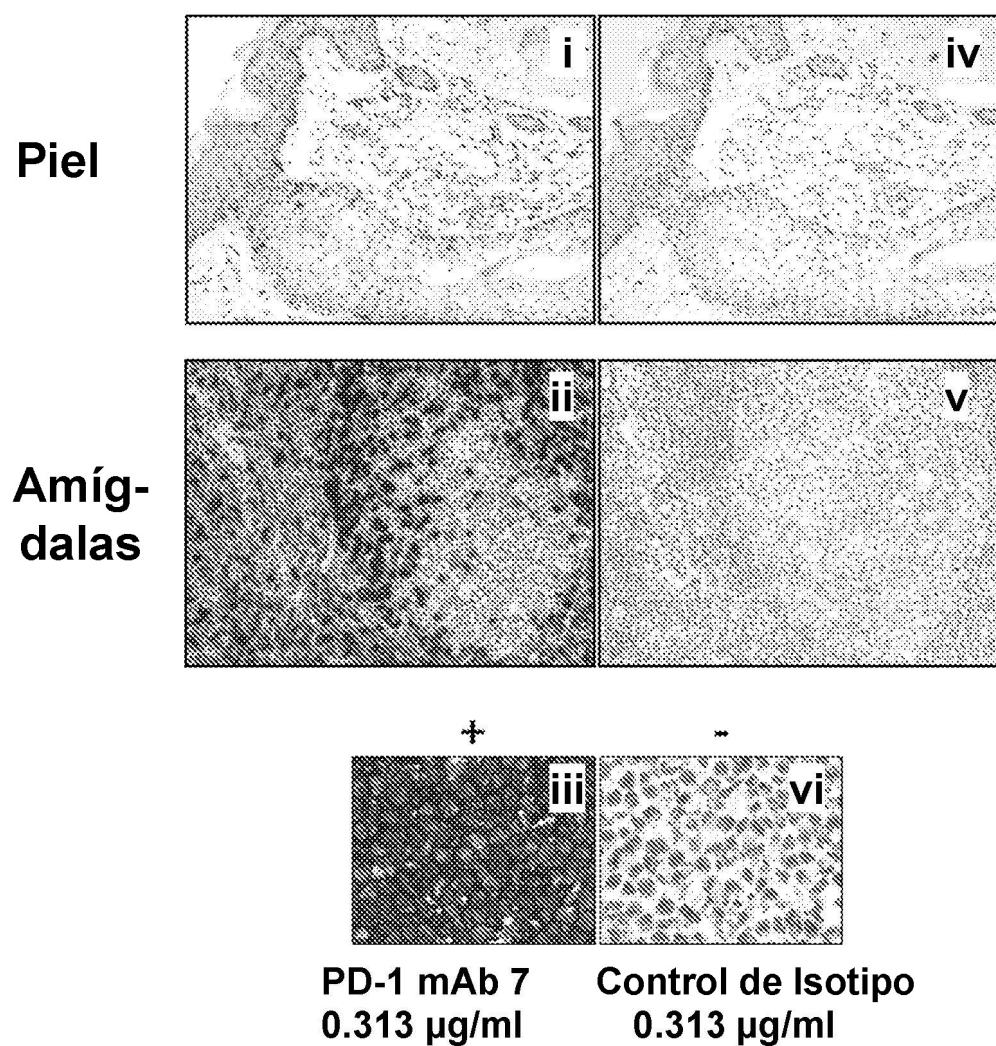
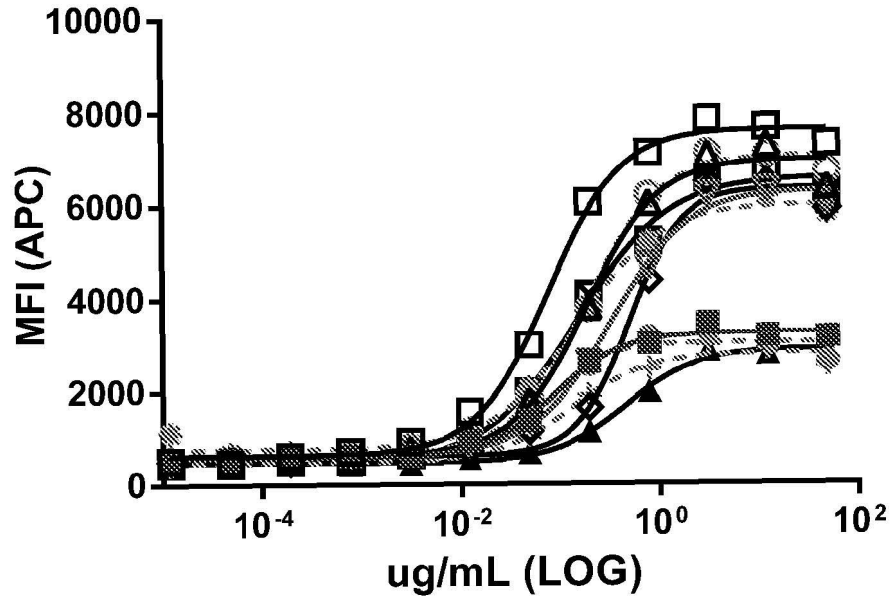


Figura 10B

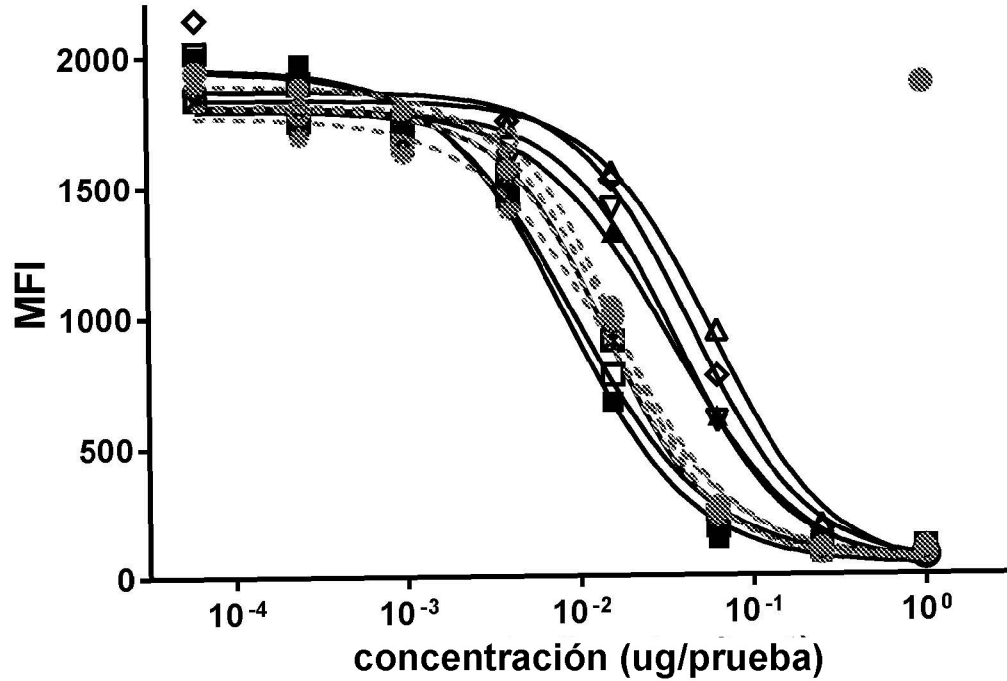
Curvas de Saturación (dilución 1:4)



- ◆ hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
- hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
- hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
- ▣ hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
- ▲ hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
- ▲ hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
- ▽ hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
- PD-1 mAb A IgG1 (AA)
- PD-1 mAb A IgG4 (P)
- ◆ PD-1 mAb B IgG1 (AA)
- ◆ PD-1 mAb B IgG4 (P)

Figura 11

Bloqueo de sPD-L1 (dilución 1:4)



- ◆ hPD-1 mAb 2 IgG1 (AA)
- hPD-1 mAb 7(1.1) IgG1 (AA)
- ▣ hPD-1 mAb 7(1.2) IgG1 (AA)
- hPD-1 mAb 7(1.2) IgG4 (P)
- ▲ hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG1 (AA)
- ▲ hPD-1 mAb 9 (1.1) IgG4 (P)
- ▼ hPD-1 mAb 15 IgG1 (AA)
- ⊖ PD-1 mAb A IgG1(AA)
- ⊖ PD-1 mAb A IgG4 (P)
- ⊖ PD-1 mAb B IgG1 (AA)
- ⊖ PD-1 mAb B IgG4 (P)
- PDL1 solo
- No teñido

Figura 12A

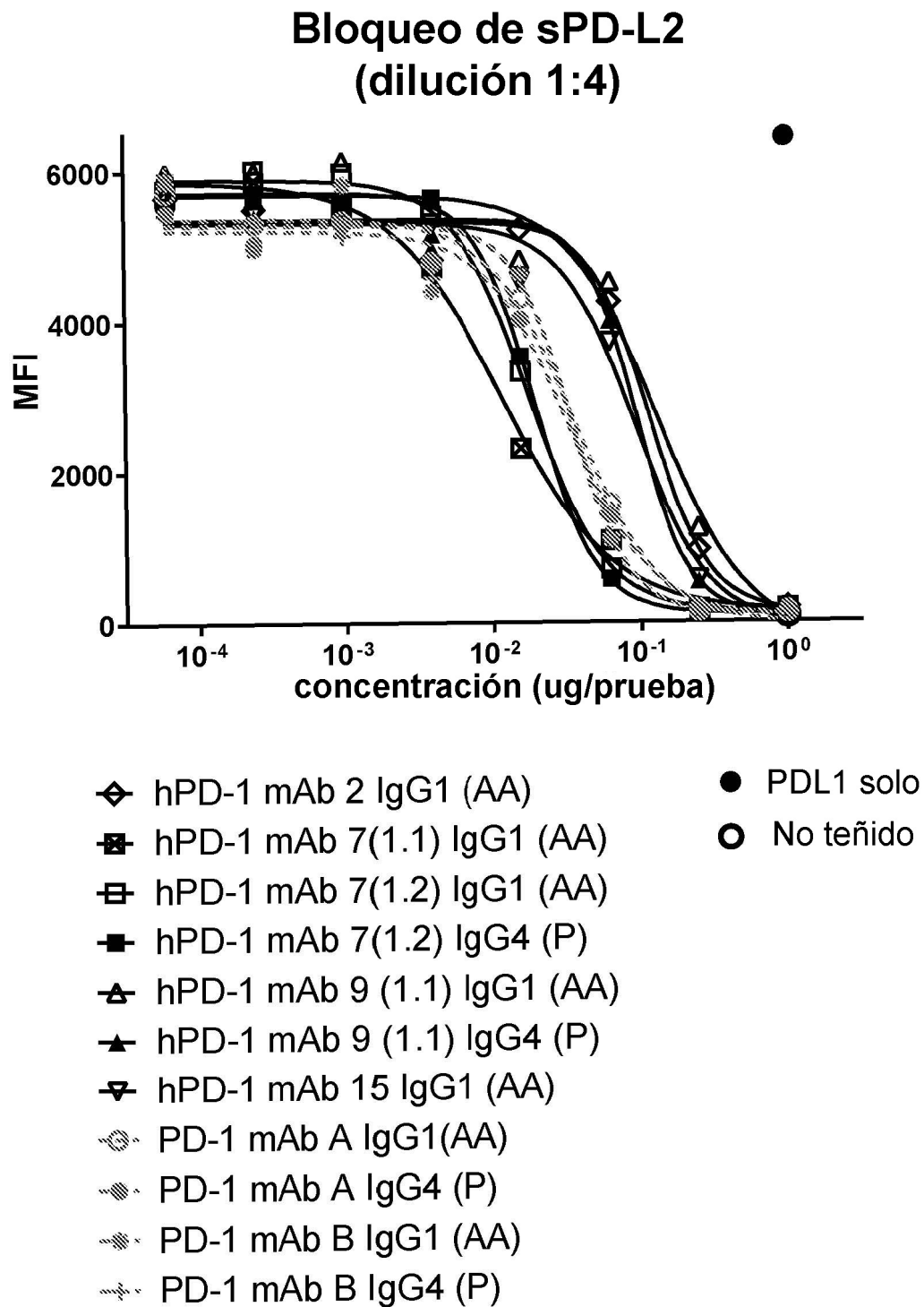


Figura 12B

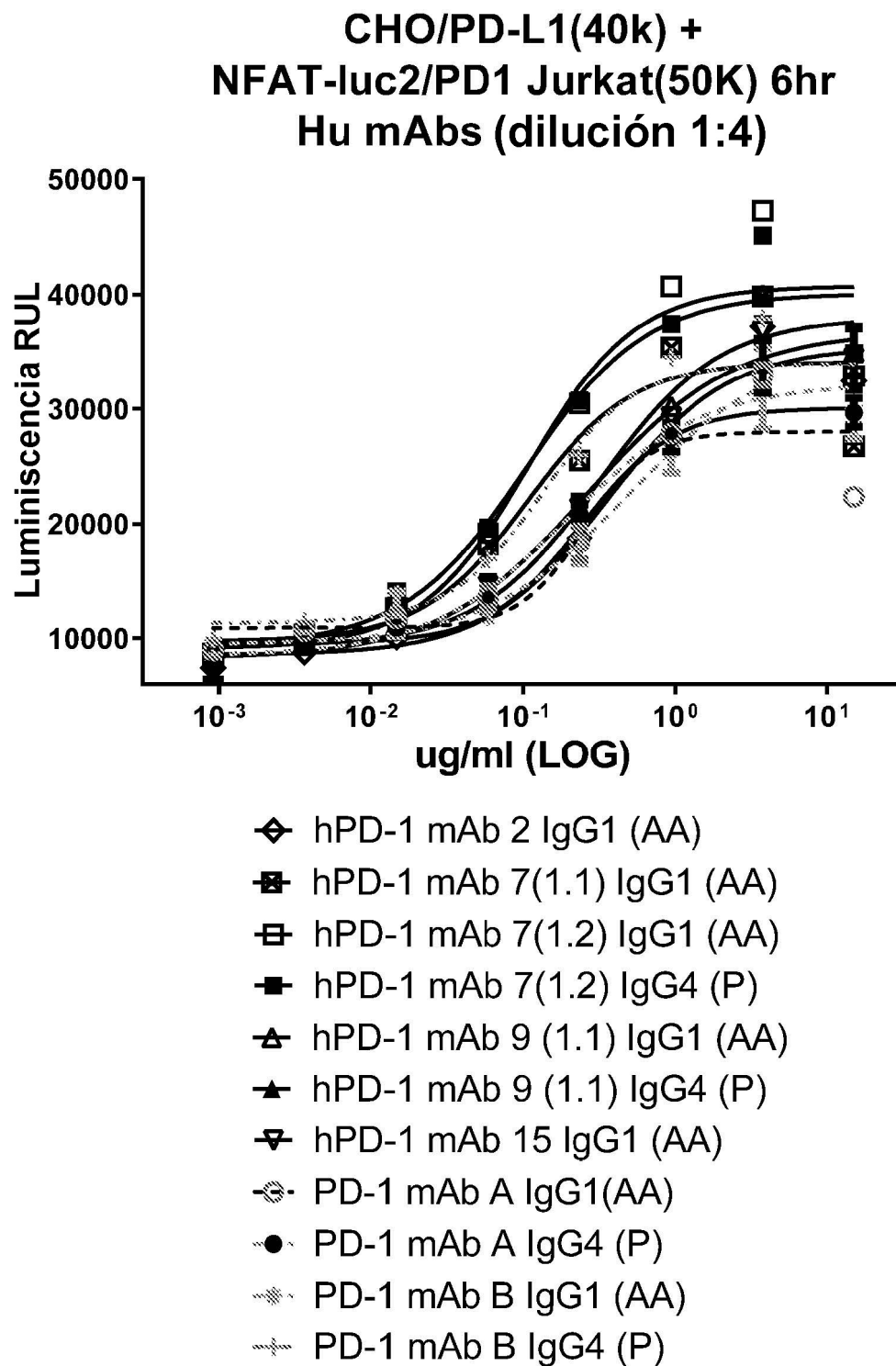


Figura 13

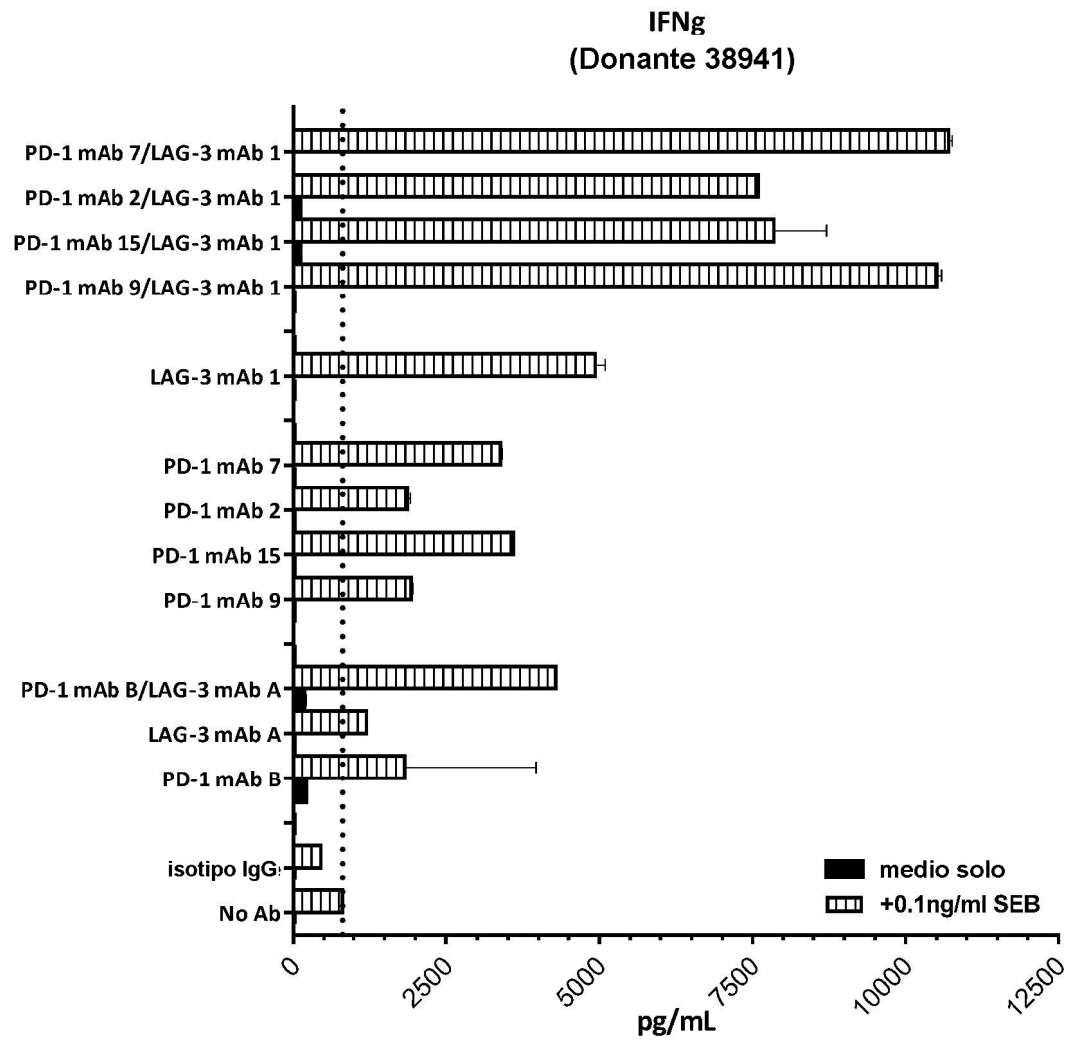


Figura 14

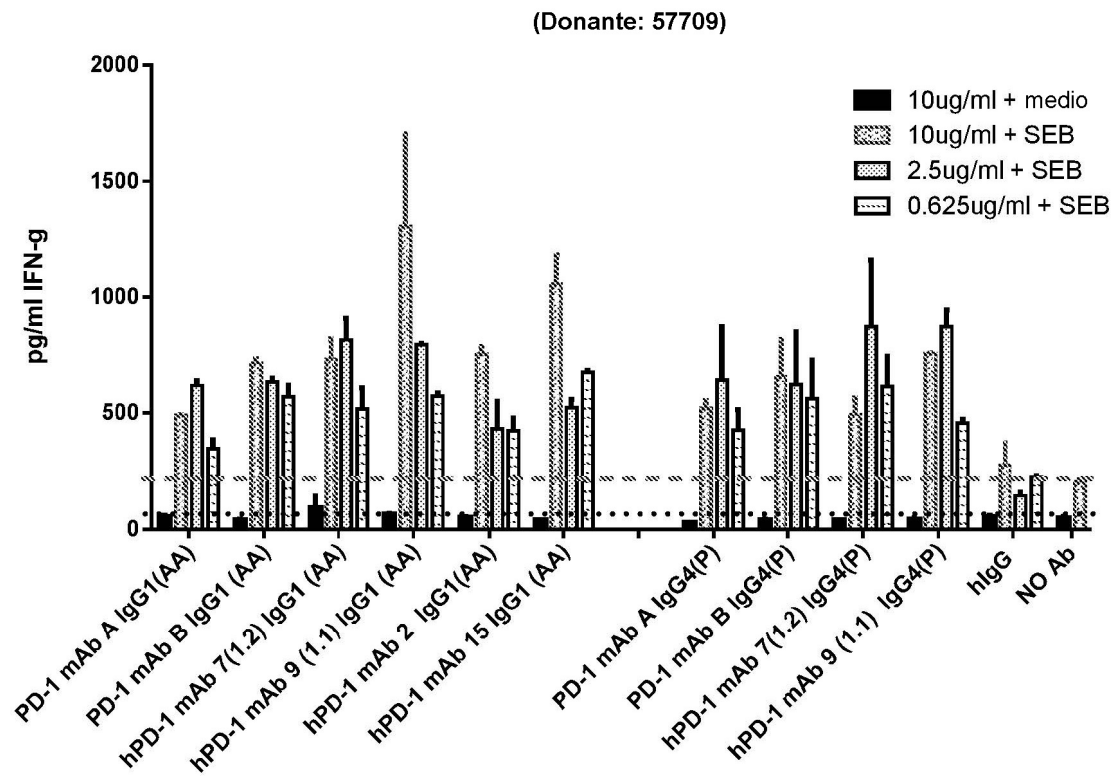


Figura 15A

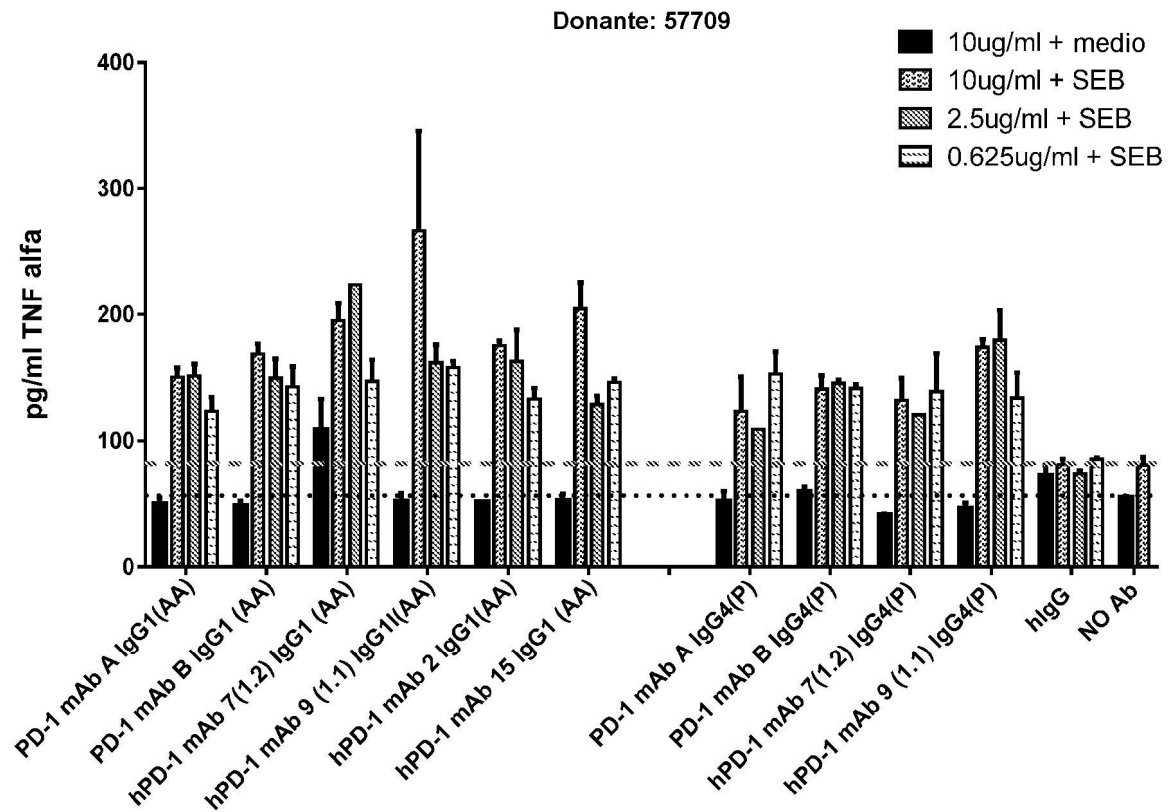


Figura 15B

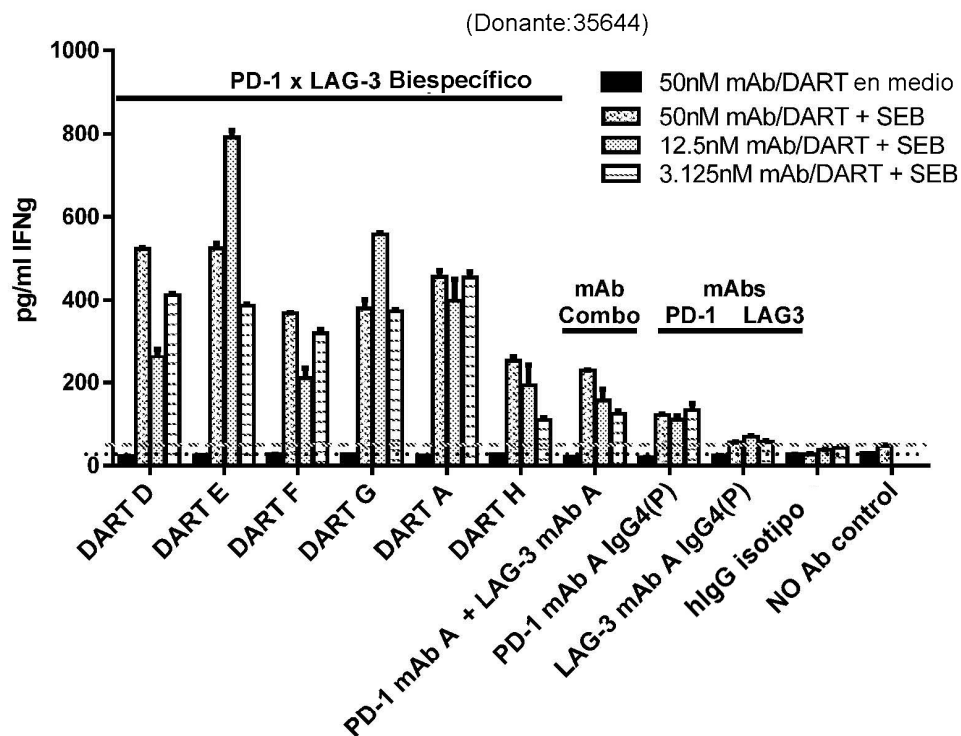


Figura 16A

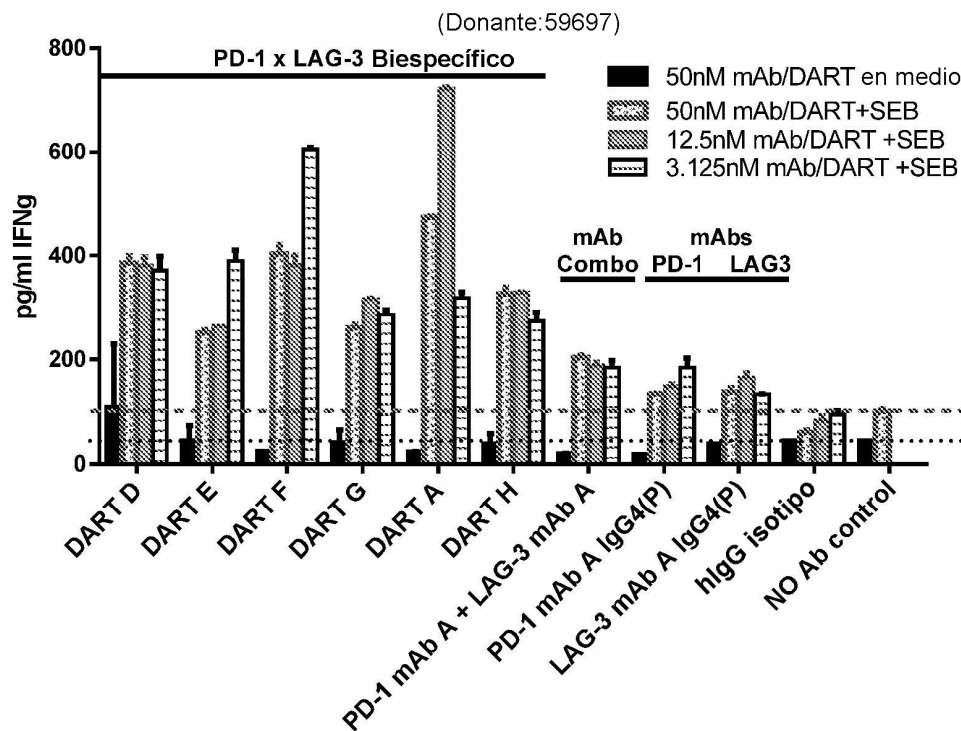


Figura 16B

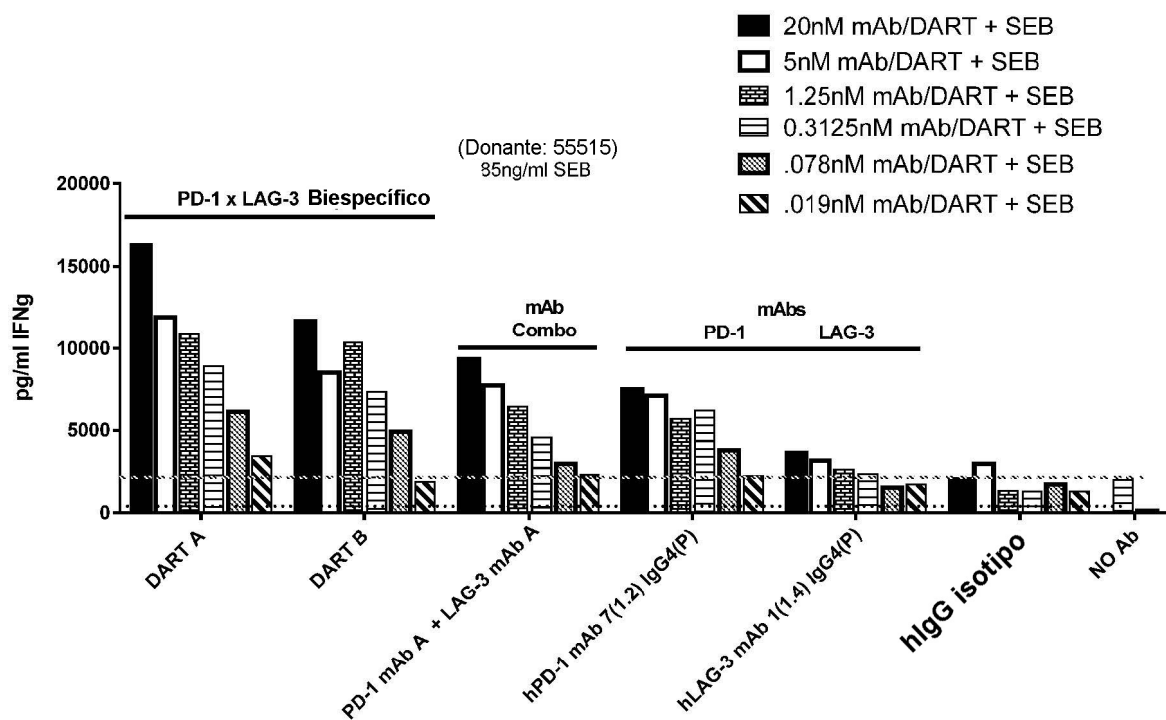


Figura 17A

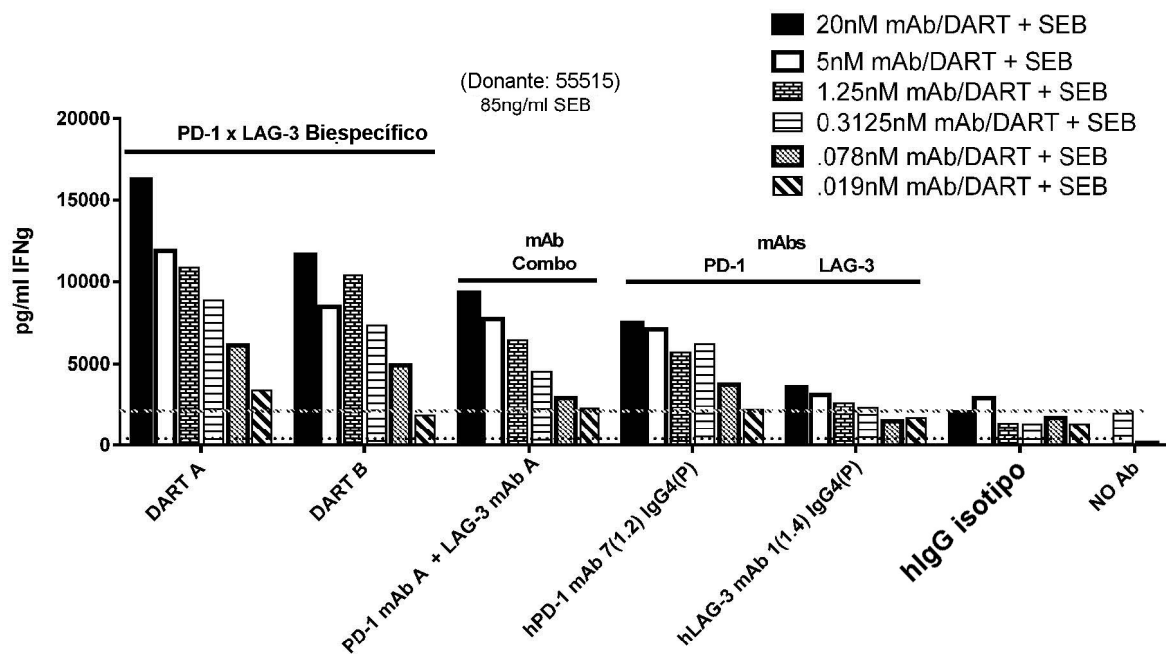


Figura 17B

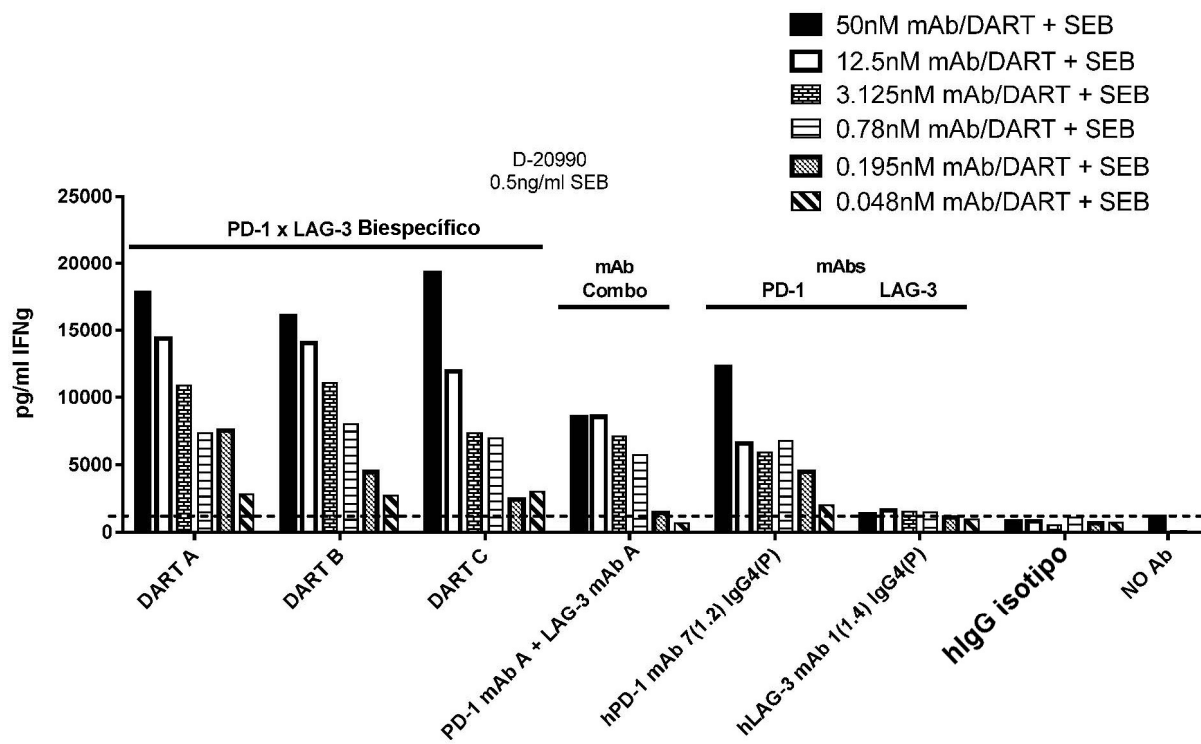


Figura 18A

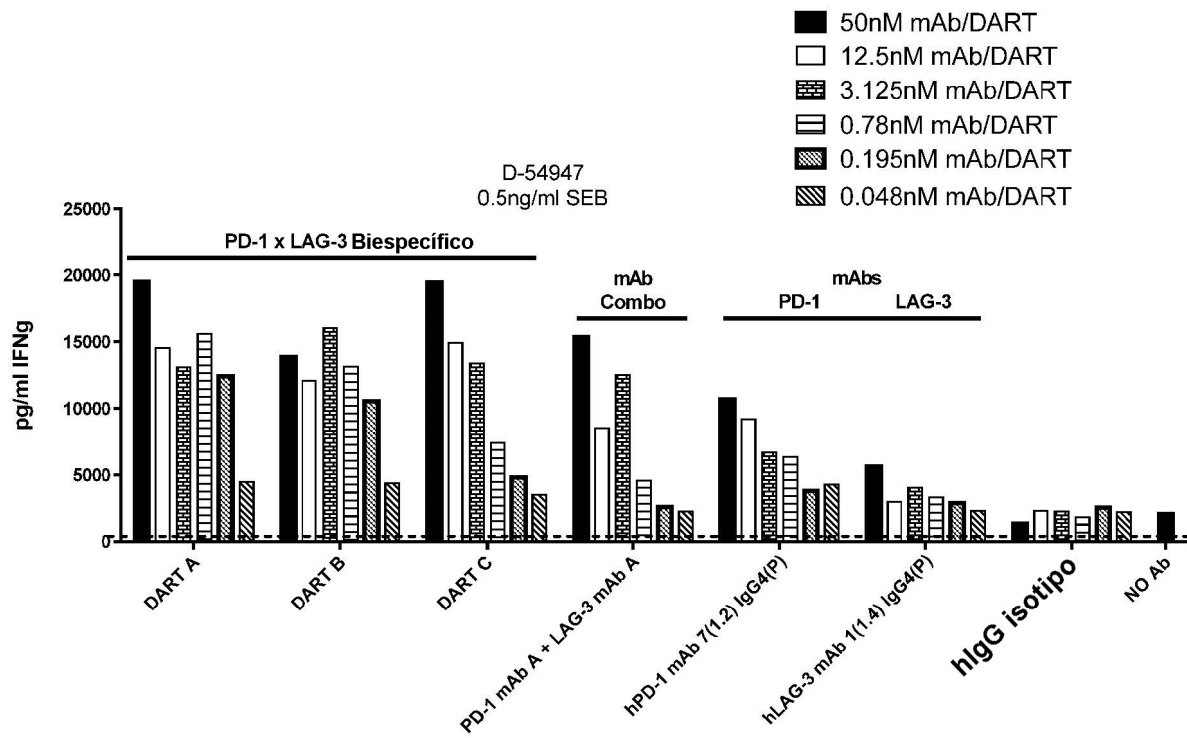


Figura 18B

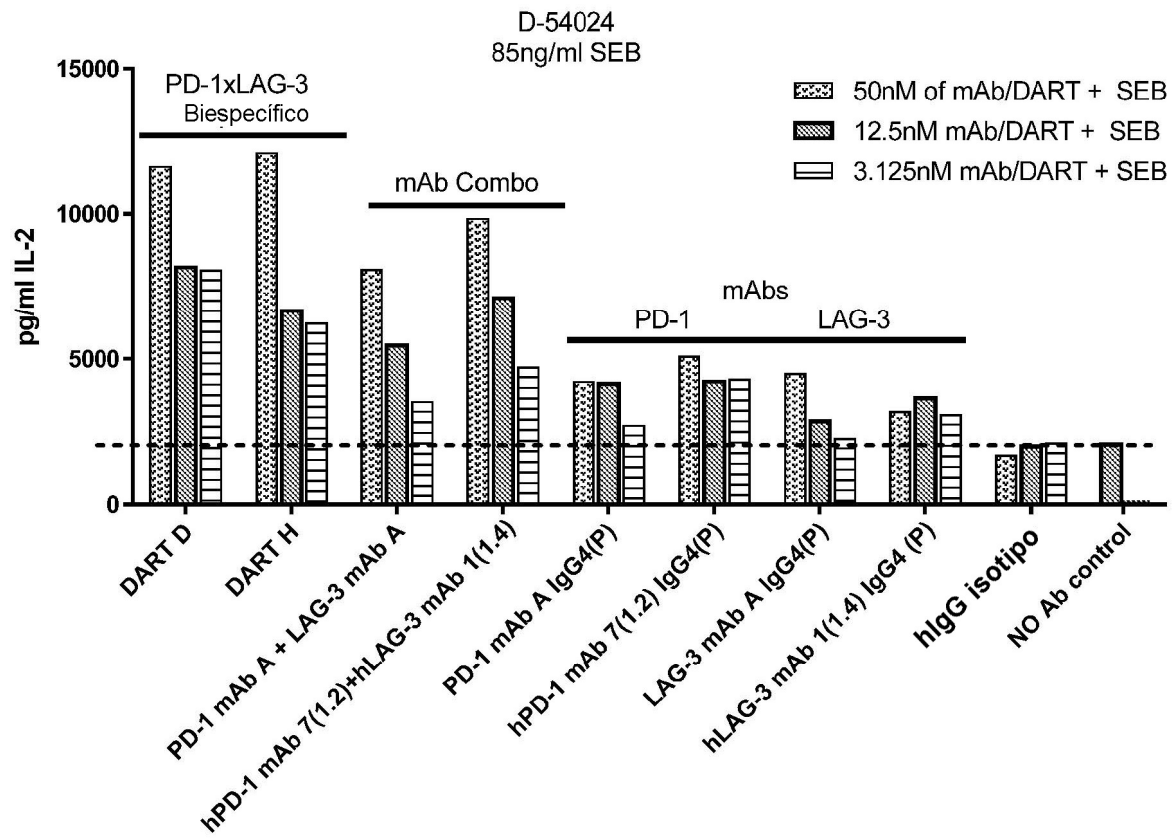


Figura 19

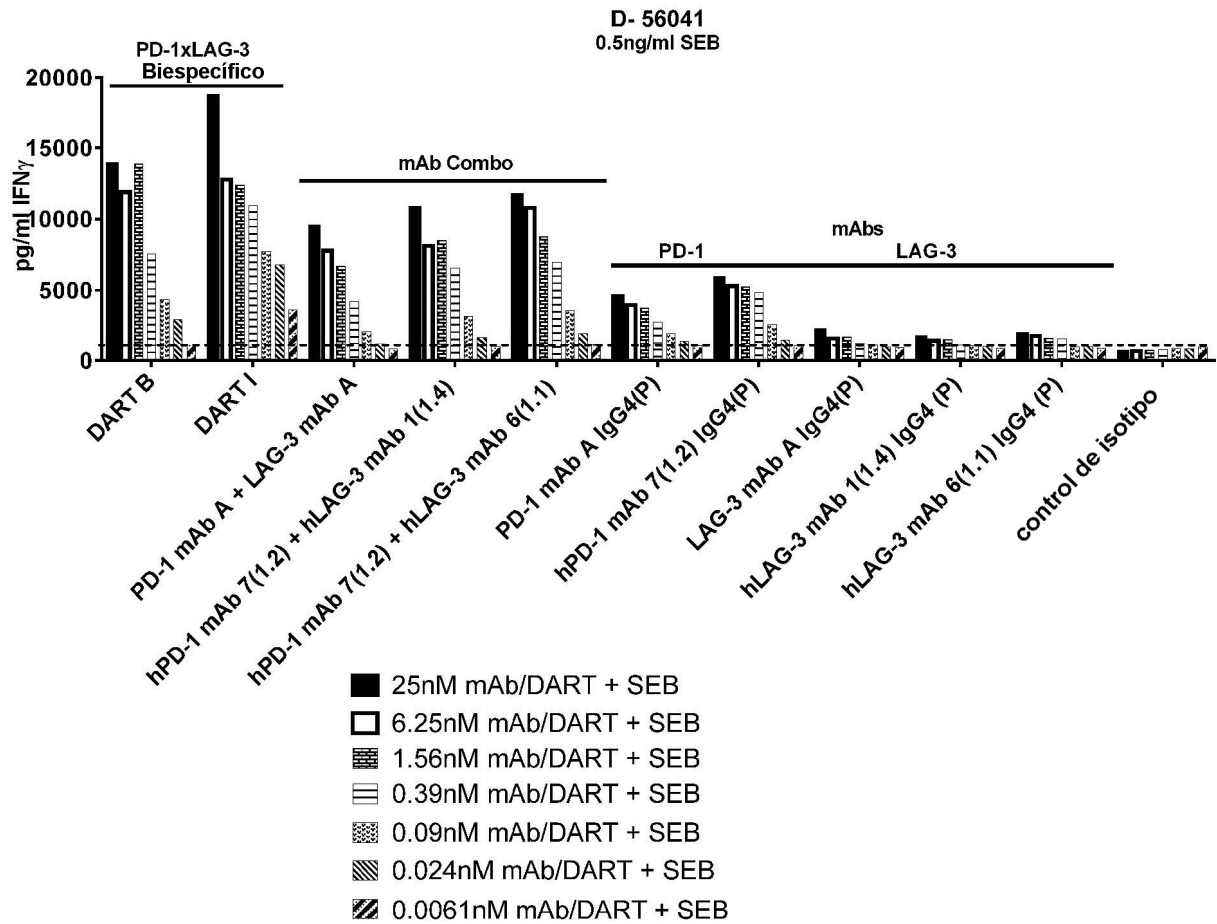


Figura 20

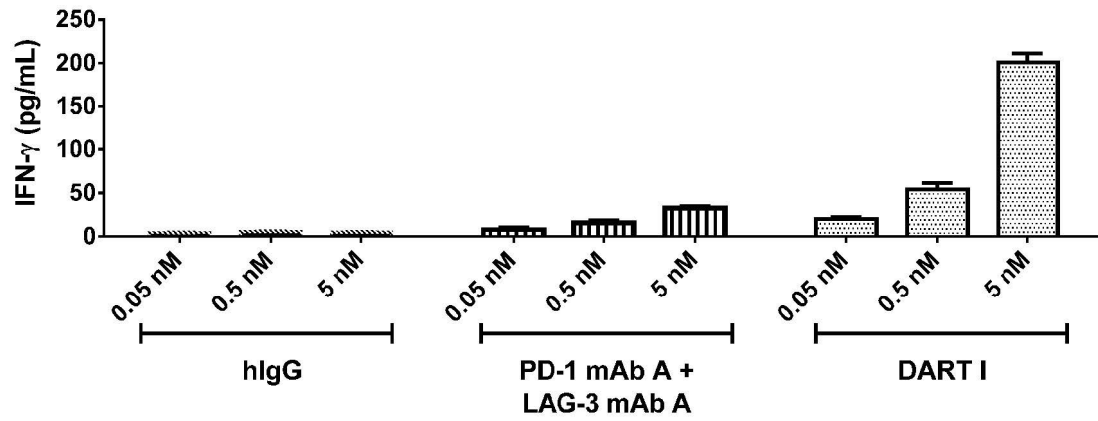


Figura 21A

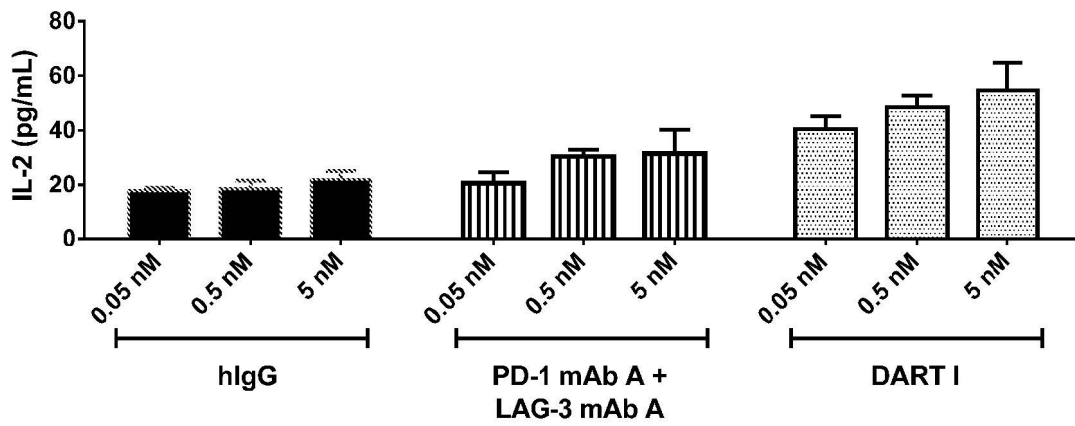


Figura 21B

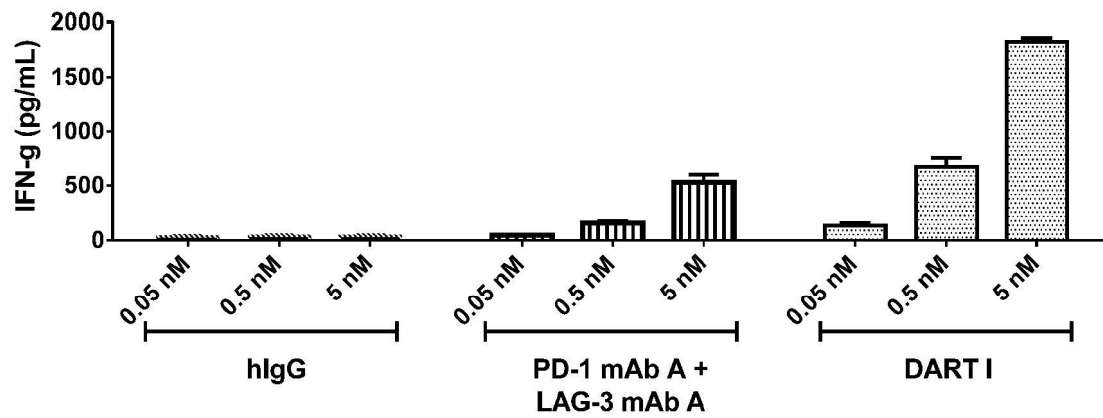


Figura 21C

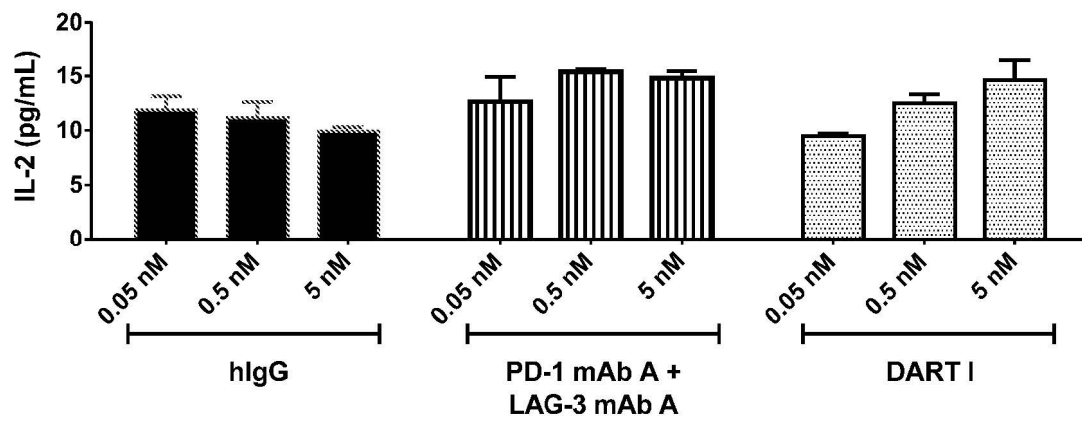


Figura 21D

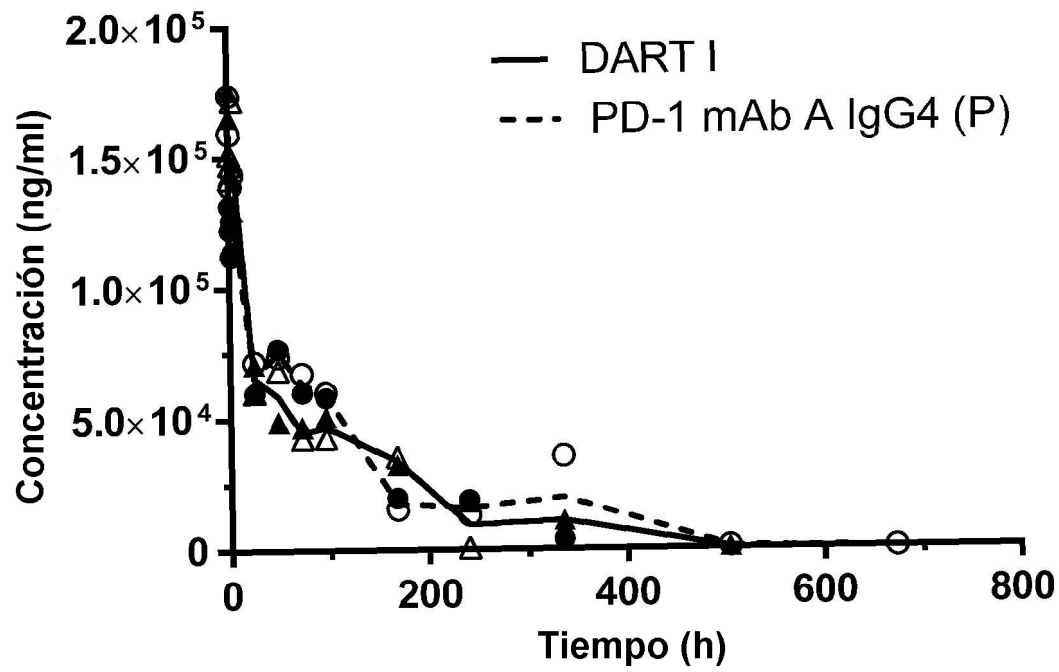


Figura 22

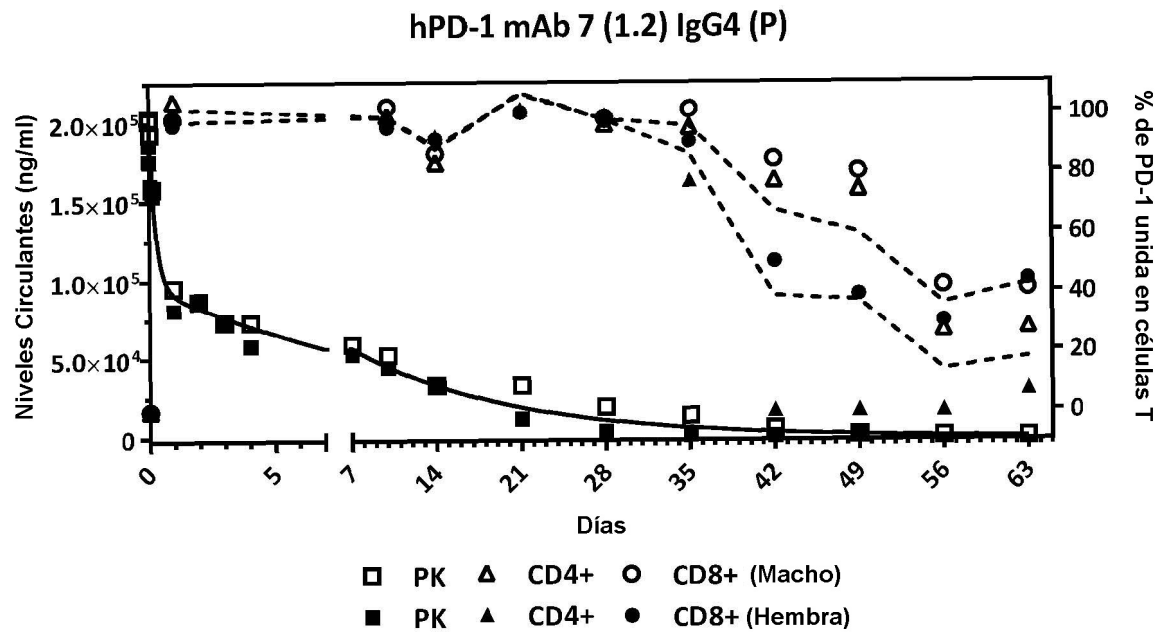


Figura 23A

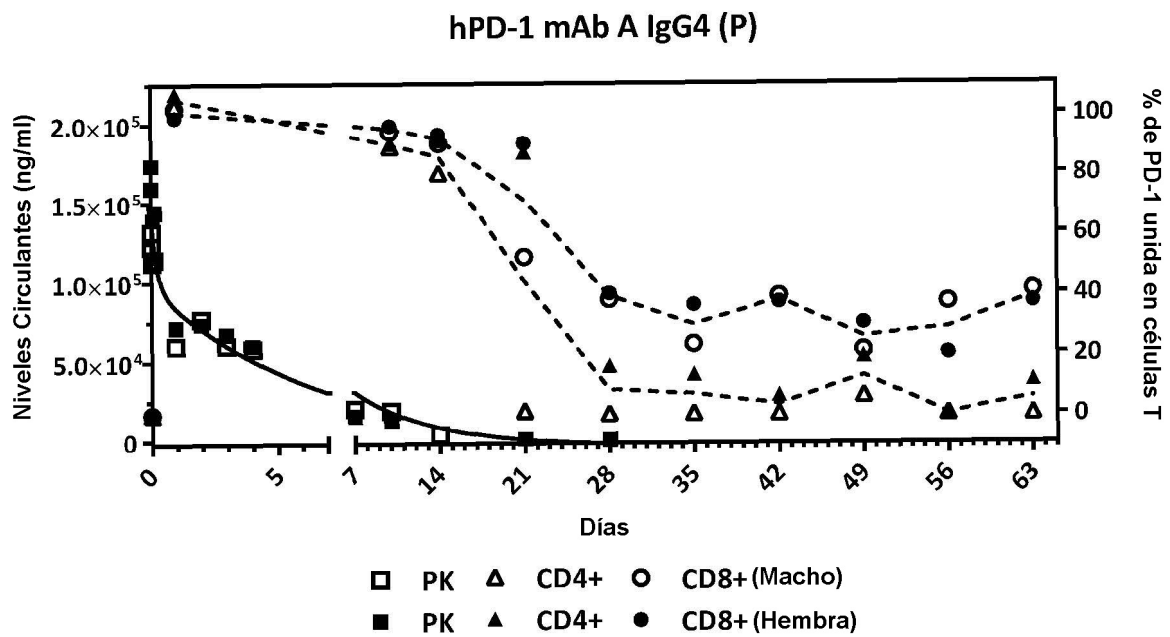


Figura 23B

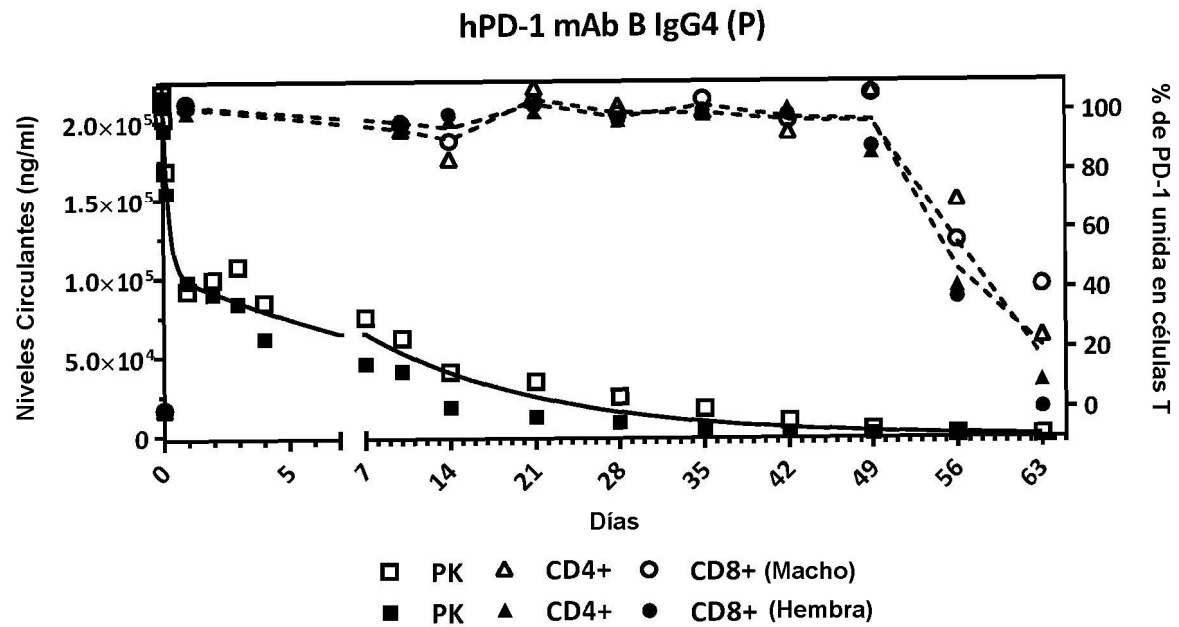


Figura 23C