

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 927**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2014** **PCT/CN2014/072574**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014** **WO14206107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2014** **E 14818708 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020** **EP 3026062**

54 Título: **Anticuerpo anti-PD-1 y su uso**

30 Prioridad:

**26.06.2013 CN 201310258289**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.05.2021**

73 Titular/es:

**SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD.**  
**(50.0%)**  
**Floor 13, Building 2, Nos. 36 and 58, Haiqu Road**  
**Shanghai 201203, CN y**  
**JUNMENG BIOSCIENCES CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHEN, BO;**  
**WU, HAI y**  
**FENG, HUI**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

### Observaciones:

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

ES 2 822 927 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-PD-1 y su uso

5 Antecedentes de la invención

Campo técnico

10 La presente invención pertenece al campo de la biomedicina y se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a PD-1 con alta afinidad. La invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención, vectores de expresión y células hospedadoras para expresar los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención, así como métodos para producir los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención. La presente invención también proporciona  
15 inmunos conjugados y composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención. La presente divulgación proporciona adicionalmente métodos para tratar una pluralidad de enfermedades (que comprenden cánceres, enfermedades infecciosas y enfermedades inflamatorias) mediante el uso de los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígenos de los mismos divulgados en el presente documento.

20 Descripción de la técnica relacionada

La proteína 1 de muerte celular programada, PD-1, es un miembro de la familia CD28 y un receptor inmunosupresor expresado en las superficies de las células T y las células B activadas (Yao, Zhu et al., Advances in target cell surface signaling molecules for Immune modulation. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12 (2): 130-146). Este receptor puede unirse  
25 a sus ligandos PD-L1 y PD-L2 para reducir eficazmente la respuesta inmune que involucra a las células T. Las células tumorales pueden escapar de la vigilancia inmunológica dentro del cuerpo a través de la alta expresión de PD-L1 (Okazaki y Honjo, PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. International Immunology, 2007, 19 (7): 813-824 2007). La interacción entre PD1 y PD-L1 puede bloquearse para mejorar significativamente la actividad de destrucción de tumores de las células T citotóxicas CD8+.

PD-1 se expresa principalmente en la superficie de células T CD4+, células T CD8+, células NKT, células B y los monocitos activados. La expresión de PD-1 es inducida principalmente por las señales del receptor de células T (TCR) o del receptor de células B (BCR). El TNF puede potenciar la expresión de PD-1 en las superficies de estas células (Francisco, Sage et al., The PD-1 pathway intolerance and autoimmunity. Immunol Rev, 2010, 236: 219-242). La PD-1 humana está codificada por el gen Pdcd1, que se encuentra en 2q37.3 y tiene 9,6 kb. Comprende cinco exones y cuatro intrones y secuencia arriba comprende un promotor de 663 pb. La estructura molecular de PD-1 comprende la región extracelular, la región transmembrana y la región intracelular. Las secuencias de aminoácidos en la región extracelular tienen un 24% de homología con CTLA-4 y un 28% de homología con CD28. Su gen tiene principalmente  
40 siete sitios polimórficos de un solo nucleótido. La región extracelular comprende un dominio estructural de IgV variable de inmunoglobulina. La región intracelular comprende dos motivos de transducción de señales basados en tirosina-ITIM (motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina) e ITSM (motivo de conversión inmunorreceptor basado en tirosina). Una vez que se activan las células T, PD-1 se asociará con la tirosina fosfatasa SHP2 principalmente a través del motivo ITSM para causar la desfosforilación de las moléculas efectoras, incluidas CD3ζ, PKCθ y ZAP70, etc.

Existen dos ligandos de PD-1: PD-L1 y PD-L2. PD-L1 también se conoce como B7H1 o CD274 y PD-L2 se conoce como B7DC o CD273. El gen PD-L se encuentra en el locus de 9p24.2 del cromosoma humano con un tamaño de 42 kb. Estos ligandos tienen una homología del 21-27% en la secuencia de aminoácidos y similitud estructural con B7-1, B7-2 e ICOSL. Los ligandos de PD-1 comprenden todos un dominio estructural de región variable similar a la inmunoglobulina, un dominio estructural similar a la región constante, una región transmembrana y una cola de citoplasma corta. La cola del citoplasma de PD-L1 está más conservada que aquella de PD-L2. PD-L1 y PD-L2 se expresan en diferentes poblaciones de células (Shimachi, Kabashima et al., Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T cells in adult T cell leukemia/lymphoma. Int J Cancer, 2007, 121 (12): 2585-2590). Estas células incluyen tejido no hematopoyético y una variedad de tipos de tumores. PD-L1 se expresa principalmente en células T, células B, células dendríticas, macrófagos, células madre mesenquimales y mastocitos derivados de la médula ósea. PD-L1 también se expresa en las células no derivadas de la médula ósea, tales como las células endoteliales vasculares, las células epiteliales, las células del músculo esquelético, los hepatocitos, las células epiteliales tubulares renales, las células de los islotes, los astrocitos cerebrales y varios tipos de tumores no linfoides tales como como melanoma, cáncer de hígado, cáncer de estómago, carcinoma de células renales, así como expresada en las células en los sitios inmunológicamente privilegiados tales como la placenta, y los ojos. Se ha sugerido que PD-L1 puede ser extensa hasta cierto grado en la regulación de las células T autorreactivas, las células B y la tolerancia inmunitaria y puede desempeñar un papel en la respuesta de las células T y las células B del tejido periférico. Sin embargo, la PD-L2 tiene una región de expresión muy limitada y existe solo en macrófagos y células dendríticas. Se cree que PD-L1 juega un papel principalmente en la presentación inmunitaria.

PD-1 y PD-L1 interactúan entre sí para regular y controlar la activación de las células T, lo que ha sido validado por muchos en tumores e infecciones virales. PD-L1 se expresa en las superficies de varias células tumorales que incluyen cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de mama, glioma, carcinoma renal, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de células escamosas orales y cáncer de cabeza/cuello. Hay una gran cantidad de células T CD8+ que expresan PD-L1 que se encuentran alrededor de estos cánceres. Las estadísticas clínicas revelan que el alto nivel de expresión de PD-L1 en las células cancerosas está relacionado con el mal pronóstico de los pacientes con cáncer (Okazaki y Honjo 2007. Citado más arriba).

Muchos virus crónicos y agudos también escapan a la vigilancia inmunológica del cuerpo a través de las señales de PD-1 y PD-L1. Por ejemplo, el nivel de expresión de PD-1 en pacientes infectados por el VIH está estrechamente relacionado con el grado de agotamiento de las células T y puede usarse como uno de los marcadores de la progresión del SIDA (Trabattoni, Saresella et al., B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. Blood, 2003, 101 (7): 2514-2520). Es el mismo caso para los pacientes diagnosticados con hepatitis B crónica (Evans, Riva et al Programmed death 1 expression during antiviral treatment of chronic hepatitis B: Impact of hepatitis B e-antigen seroconversion. Hepatology, 2008, 48 (3 ): 759-769). Las pruebas con animales revelaron que los ratones cuyo gen PD-1 ha sido eliminado pueden controlar la infección por virus mejor que los ratones normales; y se puede inducir hepatitis si las células T específicas de HBV se transfieren a los animales transgénicos con HBV. Los documentos WO2006/121168 A1, WO2009/024531 A1, WO2010/036959 A2, WO2010/029435 A1, EP2172219 A1, WO2008/156712 A1, WO2011/110604 A1 y WO2011/110621 A1 describen anticuerpos anti-PD-1 y usos terapéuticos de los mismos.

#### Breve resumen de la invención

Como se especifica en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que puede unirse a la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1) y comprende la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo o el fragmento funcional del mismo que comprende una CDR de cadena pesada seleccionada de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15 o cualquier variante de dicha secuencia, y/o una CDR de cadena ligera seleccionada de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18 o cualquier variante de dicha secuencia.

En algunos casos, el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo comprende

a) secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada seleccionadas de cualquiera de los siguientes grupos de varias secuencias de aminoácidos o sus variantes:

|   | HCDR1         | HCDR2         | HCDR3         |
|---|---------------|---------------|---------------|
| A | SEQ ID NO: 1  | SEQ ID NO: 2  | SEQ ID NO: 3  |
| B | SEQ ID NO: 7  | SEQ ID NO: 8  | SEQ ID NO: 9  |
| C | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 |

y/o secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera seleccionadas de cualquiera de los siguientes grupos de varias secuencias de aminoácidos o sus variantes:

|   | LCDR1         | LCDR2         | LCDR3         |
|---|---------------|---------------|---------------|
| A | SEQ ID NO: 4  | SEQ ID NO: 5  | SEQ ID NO: 6  |
| B | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 12 |
| C | SEQ ID NO: 16 | SEQ ID NO: 17 | SEQ ID NO: 18 |

En algunos casos, las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, así como las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera del anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente invención se seleccionan de cualquiera de los siguientes grupos de diversas secuencias de aminoácidos o sus variantes:

|   | HCDR1         | HCDR2         | HCDR3         | LCDR1         | LCDR2         | LCDR3         |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| A | SEQ ID NO: 1  | SEQ ID NO: 2  | SEQ ID NO: 3  | SEQ ID NO: 4  | SEQ ID NO: 5  | SEQ ID NO: 6  |
| B | SEQ ID NO: 7  | SEQ ID NO: 8  | SEQ ID NO: 9  | SEQ ID NO: 10 | SEQ ID NO: 11 | SEQ ID NO: 12 |
| C | SEQ ID NO: 13 | SEQ ID NO: 14 | SEQ ID NO: 15 | SEQ ID NO: 16 | SEQ ID NO: 17 | SEQ ID NO: 18 |

En algunos casos, el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente divulgación comprende a) una región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 19, 21, 23 y cualquier variante de la SEQ ID NO: 19, 21 o 23 y/o b) una región o regiones variables de la cadena ligera seleccionada de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20, 22, 24 o cualquier variante de dicha secuencia.

En un caso, dicha región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 19 o cualquier variante de la misma y dicha cadena ligera es la SEQ ID NO: 20 o cualquier variante de la misma.

5 En otro caso, dicha región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 21 o su variante y dicha región variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 22 o cualquier variante de la misma.

En otro caso, dicha región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 23 o cualquier variante de la misma y dicha región variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 24 o cualquier variante de la misma.

10 Como se especifica en las reivindicaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención está humanizado. El anticuerpo o fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente divulgación puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano.

15 El anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente divulgación puede humanizarse. Los expertos en la técnica conocen en general métodos para preparar anticuerpos humanizados. Por ejemplo, la secuencia de CDR de acuerdo con la presente invención puede transferirse a la región variable de un anticuerpo humano para preparar el anticuerpo anti-PD-1 humanizado de la presente invención. Dicho anticuerpo humanizado no producirá una respuesta anti-anticuerpos (AAR) ni una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), y no se eliminará rápidamente debido a la neutralización por anti-anticuerpo y desempeñará un papel de efecto inmunológico tal como los efectos ADCC y CDC.

20 En algunos casos, el anticuerpo PD-1 humanizado o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente divulgación comprende a) una región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consta de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 33, 35, 36 y cualquier variante de la SEQ ID NO: 33, 35 o 36, y/o b) una región variable de la cadena ligera seleccionada de la SEQ ID NO: 34, 37 y cualquier variante de la SEQ ID NO: 34 o 37.

25 El anticuerpo humanizado o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención comprende la SEQ ID NO: 33 (región variable de la cadena pesada) y la SEQ ID NO: 34 (región variable de la cadena ligera).

30 En otro caso del anticuerpo humanizado o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente divulgación, dicha región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 35 o su variante y dichas regiones variables de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 34 o su variante.

35 En otro caso del anticuerpo humanizado o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente divulgación, dicha región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 36 o su variante y dicha región variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 34 o su variante.

40 En otro caso del anticuerpo humanizado o los fragmentos funcionales del mismo de acuerdo con la presente divulgación, dicha región variable de la cadena pesada es la SEQ ID NO: 35 o su variante y dicha región variable de la cadena ligera es la SEQ ID NO: 37 o su variante.

45 La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico separada que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender la SEQ ID NO: 38 y 39. La presente divulgación proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de la SEQ ID NO: 25-30, 38-42 o cualquier combinación de las mismas.

50 La presente invención también proporciona un vector de expresión que comprende dicha molécula de ácido nucleico de la presente invención así como una célula huésped que comprende dicho vector de expresión.

55 La presente invención proporciona métodos para producir anticuerpos anti-PD-1 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende: cultivar dichas células huésped de acuerdo con la presente invención bajo la condición de permitirle producir dichos anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como la recuperación de dichos anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos producidos de esta manera.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención que se conjuga con un agente terapéutico. Como se especifica en las reivindicaciones, dicho agente terapéutico es una toxina, radioisótopo, fármaco o agente citotóxico.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención, así como un vehículo farmacéutico.

65 La presente invención proporciona además el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del

mismo, para uso en un método para prevenir o tratar enfermedades o afecciones mediante la eliminación, inhibición o disminuir la actividad de PD-1, en el que las enfermedades o afecciones son cánceres.

Por otro lado, la presente divulgación proporciona un método utilizado para prevenir o tratar enfermedades o afecciones mediante la eliminación, inhibición o disminución de la actividad de PD-1, que comprende la administración de una dosis de tratamiento eficaz del anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente invención, ácido nucleico, vector de expresión, célula huésped, inmuconjugado o composición farmacéutica a un sujeto que lo necesite, en el que: dichas enfermedades o afecciones se seleccionan del grupo que consiste en cánceres, enfermedades infecciosas y enfermedades inflamatorias. Dichos cánceres se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en melanoma, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de recto, cáncer de región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, cáncer de trompas de Falopio, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de uretra, cáncer de pene, leucemia crónica o aguda que incluye leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos durante la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o de uréter, cáncer de pelvis renal, vegetación del sistema nervioso central, linfoma del sistema nervioso central primario, angiogénesis tumoral, tumores del eje espinal, glioma de tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, carcinoma epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio ambiente que incluyen los inducidos por amiantos y la combinación de dichos cánceres, dichas enfermedades infecciosas se seleccionan preferiblemente de VIH, influenza, herpes, giardiasis, malaria, leishmaniosis, infecciones patógenas causadas por los siguientes virus: virus de la hepatitis (hepatitis A, B y C), virus del herpes (tal como VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la influenza, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus Cocksackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus vaccinia, Virus HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus del molusco, virus de la polio, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arboviral, infecciones patógenas por las siguientes bacterias: clamidia, Rickettsia, mico bacterias, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y conococos, Klebsiella, Proteus, Serratia, Pseudomonas, Legionella, difteria, salmonela, tuberculosis, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacterias de la enfermedad de Lyme, infecciones patógenas por los siguientes hongos: Candida (Candida albicans, Candida krusei, Candida glabrata, Candida tropicalis, etc.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (Fumigatus, Aspergillus niger, etc.), género de Mucor (Mucor, Absidia, Rhizopus), Sporothrix schenckii, dermatitis por levaduras, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis e Histoplasma capsulatum, infecciones patógenas por los siguientes parásitos: Entamoeba histolytica, Colon balantidium, gusanos de Fernando, espina de ameba, ventosa Giardia, Cryptosporidium, Pneumocystis carinii, P. vivax, campañoles Babesia, Trypanosoma brucei, Trypanosoma donovani, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii y Nippostrongylus brasiliensis, dichas enfermedades inflamatorias se seleccionan preferiblemente de encefalomiелitis aguda diseminada, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípido, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, artritis, enfermedad de Behçet, úlceras ampollas bullosas, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes tipo 1, síndrome hemorrágico-nefítico pulmonar, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain - Barre, enfermedad de Hashimoto, síndrome de hiperinmunoglobulina E, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, enfermedad de psoriasis, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, arteritis temporal, vasculitis y granulomatosis de Wegener.

La presente divulgación también proporciona los usos del anticuerpo o el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente divulgación, ácido nucleico, vector de expresión, célula huésped, inmuconjugado o composición farmacéutica en la preparación de fármacos para el tratamiento de enfermedades o afecciones.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

La Figura 1 muestra el tamaño de la proteína de la región estructural extracelular de PD-1 derivada de humano (hu) y Macaca fascicularis (cyto) como lo indica SDS-PAGE.

La Figura 2 muestra la combinación de rh-PD-L1 marcada con biotina y células T humanas medidas por citometría de flujo.

La Figura 3 muestra que el control de PD-L1, Clon 1, 10, 11, 55 y 64 bloquean la unión entre PD-1 en la superficie celular con el ligando PD-L1 medido por citometría de flujo.

La Figura 4 muestra la unión del control de anticuerpos, Clon 1, 10, 11, 55 y 64 con PD-1 así como con otros miembros de la familia de CD28 (ICOS, CTLA-4 y CD28).

La Figura 5 muestra los resultados de los experimentos de estimulación de la toxina del tétanos que mide la estimulación *in vitro* del anticuerpo quimérico en las células T.

La Figura 6 muestra los niveles de secreción de IL2 por los Clones hu38 ("38"), hu39 ("39"), hu41 ("41") y hu48 ("48") (control (conIgG4)) del anticuerpo humanizado medido por el Kit de ensayo de citoquinas CD8+.

La Figura 7 muestra los valores de la fluorescencia de GFP de los Clones 38, 39 y 41 en relación con el Clon 48 (IgG4 de control) del anticuerpo anti-PD-1 humanizado en experimentos en los que se cultivaron células dendríticas y las

células MD-MAB-453 modificadas juntas durante 3 días seguido de la adición de células T extraídas y cada uno de los Clones para cultivarlas juntas durante 3 días adicionales.

La Figura 8 muestra la unión entre el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención con las proteínas PD-1 derivadas de humano, *Macaca fascicularis* y de ratón.

5 La Figura 9 muestra la comparación entre las secuencias de PD-1 de humano, *Macaca fascicularis* (Cyno) y de ratón, en la que se encuadran las principales diferencias entre la proteína PD-1 de ratón y la proteína PD-1 de humano/*Macaca fascicularis*.

La Figura 10 muestra el resultado del experimento de la proliferación de células T *in vitro* estimulada por anticuerpos humanizados: respuesta de memoria a antígenos del tétano.

10 La Figura 11 muestra el resultado del experimento de la proliferación de células T *in vitro* estimulada por anticuerpos humanizados: respuesta de memoria a antígenos polipeptídicos virales.

#### Descripción detallada de la invención

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos usados en esta patente tienen los mismos significados que los técnicos ordinarios en la técnica pueden entender. En cuanto a las definiciones y términos de la técnica, los profesionales pueden referirse específicamente a Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel). La abreviatura de residuos de aminoácidos emplea una forma del código estándar de 3 letras y/o 1 letra que se usa en el campo para cada uno de los 20 L-aminoácidos comúnmente usados.

20 La presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-PD-1 y un fragmento funcional del mismo, que puede unirse a la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1). El anticuerpo y el fragmento funcional del mismo de acuerdo con la presente divulgación tiene al menos una de las siguientes características: la capacidad de bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1 a través de alta afinidad, o unirse a PD-1 con alta especificidad pero no a otros miembros de la familia CD28 (tales como ICOS, CTLA-4 y CD28), o activar las células T específicas del tumor para matar las células tumorales y promover que CD8+ ingrese al tejido del tumor sólido para aumentar en gran medida los niveles de los efectores inmunes tales como IPN $\gamma$ .

25 La presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 humanizado y un fragmento de unión a antígeno del mismo, como se especifica en las reivindicaciones. Dicho anticuerpo humanizado se obtiene mediante el diseño de simulación por ordenador del anticuerpo derivado de ratón producido por ratón inmunizado en combinación con tecnología de presentación en bacteriófagos. En consecuencia, sus epítomos de unión también se identifican en función de sus características de unión con proteínas PD-1 de diversas especies. Excepto por las características ventajosas del anticuerpo anti-PD-1 y el fragmento funcional del mismo descritas anteriormente, dicho anticuerpo anti-PD-1 humanizado y el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente invención también se une a proteínas PD-1 de humanos o *Macaca fascicularis* por alta afinidad, pero no interactúa con la proteína PD-1 derivada de ratón.

30 Con la premisa de no influir sustancialmente en la actividad del anticuerpo, los expertos en la técnica pueden reemplazar, agregar y/o eliminar uno o más (tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 o más) aminoácidos de la secuencia de acuerdo con la presente divulgación para producir una variante de la secuencia de dicho anticuerpo o el fragmento funcional del mismo. Por ejemplo, el aminoácido de la región variable se puede reemplazar por uno de propiedad similar. La secuencia de dicha variante de acuerdo con la presente divulgación puede tener una identidad de al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con su secuencia fuente. Dicha identidad de secuencia descrita en la presente divulgación puede medirse mediante un software de análisis de secuencia, por ejemplo, el programa informático BLAST usando un parámetro predeterminado, especialmente BLASTP o TBLASTN.

35 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser de longitud completa (por ejemplo, anticuerpo IgG1 o IgG4) o comprender solo la parte que se une a un antígeno (por ejemplo, fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub> o scFv), o un anticuerpo que ha sido modificado para afectar su función. La presente invención comprende el anticuerpo anti-PD-1 que comprende un patrón de glicosilación modificado. En algunas aplicaciones, es útil realizar modificaciones para eliminar los sitios de glicosilación indeseables o evitar la parte de fucosa en la cadena de oligosacáridos para, por ejemplo, mejorar el anticuerpo de la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). En algunas otras aplicaciones, la modificación de la galactosilación se puede realizar para cambiar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

40 Los términos usados en esta patente: "fragmento funcional" se refiere especialmente al fragmento de anticuerpo tal como el , fragmento Fv, scFv (sc se refiere a una sola hebra), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc o diacuerpo, o cualquier fragmento cuya vida media posiblemente deba aumentarse mediante modificación química o incorporación al liposoma. Dicha modificación química es, por ejemplo, la adición de polialquilenglicol tal como polietilenglicol ("pegilación, PEGilado") (referido como un fragmento pegilado tal como Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')<sub>2</sub>-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" es polialquilenglicol) y dicho fragmento tiene actividad de unión a EGFR. Preferiblemente, dicho fragmento funcional comprende una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera de su anticuerpo fuente. Dicha secuencia parcial mantiene suficiente especificidad y afinidad de unión a antígeno, que son las mismas que las de su anticuerpo fuente. En cuanto a PD-1, la afinidad es preferiblemente al menos 1/100, y más preferiblemente al

menos 1/10, de la afinidad de su anticuerpo fuente. Dicho fragmento funcional comprende al menos 5 aminoácidos y preferiblemente comprende 10, 15, 25, 50 y 100 aminoácidos continuos de su secuencia de anticuerpo fuente.

Los técnicos expertos en la materia pueden clonar la molécula de ADN que codifica dicho anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con la presente invención en un vector y luego transformarlo en una célula huésped. De esta manera, la presente divulgación también puede proporcionar un tipo de vector de ADN recombinante, que comprende una molécula de ADN que codifica dicho anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, dicho vector de ADN recombinante es un tipo de vector de expresión. Los técnicos expertos en la materia pueden clonar la molécula de ADN de dicho anticuerpo en el vector de expresión y transformarlo en célula huésped para obtener el anticuerpo mediante expresión de inducción. El vector de expresión de acuerdo con la presente invención comprende la secuencia de ADN codificante de la región variable de la cadena pesada, la región variable de la cadena ligera y opcionalmente de la región constante del anticuerpo anti-PD-1. No obstante, en un caso de la presente divulgación, también se pueden construir dos tipos de vectores de expresión por separado: uno que comprende la región variable de la cadena pesada y la región constante y otro que comprende la región variable de la cadena ligera y la región constante. En un caso de la presente divulgación, los dos tipos de vectores de expresión se introducen luego en el mismo mamífero. En una realización preferida, dicho vector de expresión comprende además un promotor y una secuencia de ADN que codifica el péptido señal secretor, así como al menos un tipo de gen resistente a fármacos utilizado para cribar.

Las células huésped de acuerdo con la presente invención pueden ser células huésped procariotas, células huésped eucariotas o bacteriófagos. Dicha célula huésped procariota puede ser de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* o *Proteus mirabilis*, etc. Dicha célula huésped eucariota puede ser de hongos como *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, levadura de fisión y *Trichoderma*, células de insectos tales como *Spodoptera frugiperda*, células vegetales tales como tabaco, células de mamífero tales como células BHK, células CHO, células COS y células de mieloma. En algunas realizaciones, las células huésped de acuerdo con la presente invención son preferiblemente células de mamífero, más preferiblemente, células BHK, células CHO, células NSO o células COS.

El término "composición farmacéutica" utilizado en este documento se refiere a la combinación de al menos un tipo de fármaco y vehículos o excipientes farmacéuticos seleccionados al azar para un propósito especial. En algunas realizaciones, dicha composición farmacéutica incluye las combinaciones, que están separadas en el tiempo y/o en el espacio siempre que puedan funcionar sinérgicamente para realizar el propósito de la presente invención. Por ejemplo, los ingredientes contenidos en dicha composición farmacéutica (por ejemplo, el anticuerpo, molécula de ácido nucleico, combinación y/o conjugado de molécula de ácido nucleico) se pueden administrar al sujeto como un todo o por separado. En el caso de que los ingredientes contenidos en dicha composición farmacéutica se administren por separado al sujeto, se pueden utilizar simultáneamente o a la vez. Preferiblemente, dicho vehículo farmacéutico es agua, solución acuosa tampón, soluciones salinas isotónicas tales como PBS (tampón de fosfato), glucosa, manitol, dextrosa, lactosa, almidón, estearato de magnesio, celulosa, carbonato de magnesio, glicerol al 0,3%, ácido hialurónico, etanol o polialquilenglicoles tales como polipropilenglicol, triglicéridos y otros. El tipo de vehículo farmacéutico puede seleccionarse basándose en si la composición de acuerdo con la presente invención está formulada para administrarse por vía oral, intranasal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa. La composición de acuerdo con la presente invención puede comprender un agente humectante, un emulsionante o una solución tampón como aditivo.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede administrarse por cualquier vía apropiada, por ejemplo, oral, intranasal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa.

En un aspecto relevante que cae dentro del alcance de las reivindicaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-1 y un segundo agente terapéutico. En una realización que cae dentro del alcance de las reivindicaciones, el segundo agente terapéutico es cualquier agente ventajoso para combinar con el anticuerpo anti-PD-1. Ejemplos de tales agentes ventajosos para combinar con el anticuerpo anti-PD-1 incluyen, pero no se limitan a, otros agentes que pueden inhibir la actividad de PD-1 (incluidos los fragmentos, el inhibidor de péptidos, los antagonistas de molécula pequeña etc., unión a otros anticuerpos o antígenos) y/o los agentes que pueden interferir con la transducción de señales secuencia arriba o secuencia abajo de PD-1.

Los términos "prevenir o tratar enfermedades o afecciones mediante la eliminación, inhibición o disminución de la actividad de PD-1" se refieren a las enfermedades o afecciones causadas por la expresión de PD-1 o aquellas enfermedades o afecciones con los síntomas/características de la expresión de PD-1. En algunos casos de la presente divulgación, dichas enfermedades o afecciones son cánceres o enfermedades infecciosas. Como se especifica en las reivindicaciones, las enfermedades o afecciones de la invención son cánceres. Dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de mama, glioma, cáncer renal, cáncer gástrico, cáncer de esófago, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de cabeza/cuello. Dichas enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan a, la infección por VIH y la infección por el virus de la hepatitis B.

El término "dosis de tratamiento eficaz" utilizado en esta patente se refiere a una dosis suficiente para conferir beneficio al objetivo de aplicación. La dosis administrada, la velocidad de administración y la duración pueden depender de las condiciones y la gravedad del objetivo a tratar. La prescripción del tratamiento (por ejemplo, la determinación de la dosis) la determina un médico, que puede considerar factores tales como la enfermedad a tratar, el estado del paciente individual, el lugar de administración y el método de administración.

El término "sujeto" utilizado en esta patente se refiere a mamíferos tales como humanos u otros animales, por ejemplo, animales silvestres (garza, cigüeña, grulla, etc.), ganado (pato, ganso, etc.) o animales de laboratorio (orangután, mono, rata, ratón, conejo y conejillo de indias, etc.).

Se proporcionan algunos de los siguientes ejemplos para probar y explicar adicionalmente algunas realizaciones preferidas de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1. Clonar la región estructural extracelular de PD1 humana en un plásmido de expresión eucariota

Se extrajo el ARN total de células de sangre periférica humana (Centro de Sangre de la Cruz Roja de Beijing) con el kit de extracción de ARN Trizol (Invitrogen) y se obtuvo el ADNc con un kit de transcripción inversa de Invitrogen. El fragmento extracelular de PD1 se obtuvo mediante amplificación por PCR del ADNc usando el cebador secuencia arriba 5'-GTACGCTAGCCACCATGTCAGATCCCACAGGC-3' (SEQ ID NO: 31) y el cebador secuencia abajo 5'-GATCCTCGAGCCACCAGGGTTTGGAAGT-3' (SEQ ID NO: 32). El producto amplificado fue digerido por *NheI* y *XhoI* y clonado en el sistema de plásmido de expresión eucariota de pCDNA3.1. Se transfectaron células 293T (ATCC) con este plásmido durante 3 días, se recogió el sobrenadante del cultivo celular para purificar h-PD1. También se extrajo el ARN total de las células de sangre periférica de *Macaca fascicularis* y el ADNc producido se clonó en el vector de expresión eucariota.

Como se muestra en la Figura 1, debido a la modificación postraduccional tal como la glicosilación, los tamaños de las proteína de las regiones estructurales extracelulares de PD-1 de PD-1 derivada de humano (hu) y derivada de *Macaca fascicularis* (cyno) fueron de aproximadamente 50.000 Dalton después de tinción con azul de Coomassie.

### Ejemplo 2. Pruebe la combinación de la PD-1 en células y el ligando PD-L1

#### 1. Aislar células T de células de sangre periférica humana

Cuando la suspensión de células de sangre periférica (Instituto de Sangre de Beijing) fluye a través de una columna de fibra de nailon (Compañía de Biotecnología Hede de Beijing, las células B, las células plasmáticas, las células mononucleares y algunas células auxiliares se adherirán selectivamente a la fibra de nailon, aunque la mayoría las células T pasan a través de una columna de fibra de nailon y, por lo tanto, producen la población de células T enriquecida. El procedimiento se describe simplemente de la siguiente manera: tomar una jeringa de vidrio de 50 ml, extraer el émbolo de la jeringa y colocar una manguera de goma con pinza en la boquilla de la jeringa. Atar algunas fibras de nailon e insértelas en la jeringa. Fijar la jeringa en el soporte y verter el fluido de cultivo celular RPMI a 37 °C para pretratar las fibras de nailon. Cerrar la válvula, abrir la válvula después de 0,5 horas para liberar el fluido de cultivo celular. Diluir el fluido celular que se va a separar con fluido de cultivo RPMI precalentado a una concentración apropiada aproximadamente  $5,00 \times 10^7$  células/ml. Verter el líquido celular en la jeringa y sumergir la columna de fibra de nailon. Cubrir la jeringa e incubar a 37 °C durante 1 hora. Abrir la abertura inferior, liberar el líquido lentamente (1 gota/min) y recoger en un tubo de centrifuga. Centrifugar a 1000 xg durante 10 minutos para obtener los linfocitos T deseados.

#### 2. Conjuguar proteína recombinante rh-PD-L1 con biotina

Mezclar 100 µg de proteína recombinante rh-PD-L1 (adquirida a través de Sino Biological Inc. de Beijing) con biotina-ácido amino-caproico-NHS (Thermo) disuelto en DMSO en una proporción molar de 1:4 y mantener la mezcla todavía a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, pase la mezcla de reacción a través de la columna de gel G25 (Thermo) para separar la rh-PD-L1 marcada con biotina y las biotinas libres.

#### 3. Combinar la rh-PD-L1 marcada con biotina con células T humanas

La proteína recombinante rh-PD-L1 conjugada con diferentes concentraciones de biotinas se mezcló con  $10^5$  células T aisladas de acuerdo con el método anterior. La mezcla se incubó a 4 °C durante 15 minutos. Después de lavar tres veces con PBS, se añadió estreptavidina-aloficocianina (Thermo) (SA-APC) a razón de 0,2 µg/ml y se incubó con la mezcla a 4 °C durante 20 minutos. Después de lavar tres veces más con PBS, las muestras se midieron a 660 nm usando FACSCalibur Beckman Dickson. Como se muestra en la Figura 2, el resultado muestra que la proteína PD-L1 conjugada con biotina puede unirse a las células T.

## Ejemplo 3. Preparación de anticuerpo anti-rh-PD-1

## 1. Inmunización animal

- 5 Se mezclaron 10 µg de proteína recombinante rh-PD-1 de 1 mg/ml como antígeno con adyuvantes inmunes equivalentes (adyuvante de Freund (Sigma-Aldrich)) y se inmunizaron subcutáneamente tres ratones hembra FVB de 6 semanas de edad. Después de la primera inmunización, se administró la misma dosis una vez por semana para reforzar la inmunización.

## 10 2. Fusión celular

- Después de la última inyección de inmunización mejorada, se recogieron los ganglios linfáticos de la raíz del muslo de los ratones y se molieron en solución salina normal. La suspensión producida, enriquecida con células B, se fusionó con las células SP2/0 mediante el método convencional de transferencia electroforética (véase el manual del electroporador BTX). Las células de fusión se cultivaron en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C en el medio de cultivo completo RPMI-1640 que contenía HAT (Sigma) para cultivo.

## Ejemplo 4. Experimento de bloqueo del ligando y del receptor

- 20 A partir de 20.000 de las líneas celulares de hibridoma monoclonal, se empleó la reacción de marcaje enzimático (ELISA) para cribar los 1220 clones de anticuerpos secretados, que pueden unirse a las proteínas PD-1. Cinco de estos 1220 clones de anticuerpos tenían la capacidad de inhibir la unión entre la PD-L1 marcada con biotina y el receptor de PD-1 en las células T en diversos grados.
- 25 Se incubó 1 µg/ml de cada uno de los cinco anticuerpos descritos anteriormente con 312 ng/ml de rh-PD-L1 marcado con biotina (concentración) a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después, la mezcla se incubó con células T aisladas de células de sangre periférica humana a 4 °C durante 15 minutos. Después de lavar tres veces con solución salina normal se añadieron 0,2 µg/ml de SA-APC a la mezcla, y se incubó a 4 °C durante 15 minutos. Después de lavar tres veces con solución salina normal, las muestras se midieron con un citómetro de flujo de BD para verificar si los anticuerpos pudieron inhibir la unión de la rh-PD-L1 y el receptor PD-1 en la superficie de la célula T.

Como se muestra en la Figura 3, los clones 1, 10 y 11 pueden bloquear la unión de PD-1 con el ligando PD-L1 en la superficie celular, mientras que los clones 55 y 64 solo pueden jugar un papel de inhibición débil.

## 35 Ejemplo 5. Unión de los anticuerpos candidatos a otros miembros de la familia CD28

- Para probar además la especificidad de unión de los clones de anticuerpos candidatos 1, 10, 11, 55 y 64, se usó 1 µg/ml de rh-PD-1 o los otros miembros de la familia CD28, es decir, ICOS, CTLA-4 y CD28 (R&D System) en la solución tampón de carbonato (0,05 M, pH 9) para revestir una placa de marcaje enzimático de 96 pozos y se mantuvo a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, se retiró la solución de los pozos y estos se lavaron tres veces con un tampón de lavado (PBS + TWEEN al 0,5%). Se añadió una solución de PBS que contenía BSA al 3% a los pozos para bloquearlos durante 20 minutos. Después de lavar tres veces con el tampón de lavado, se añadieron 100 µL de cada clon de anticuerpo a razón de 1 µg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de tres lavados con el tampón de lavado, se diluyó el anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con HRP (Jackson Immunoresearch) en el tampón de lavado 1:10000, se añadió a los pozos de la muestra y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de tres lavados con el tampón de lavado, se añadieron 50 µL de la solución del sustrato TMB (tetrametilbencidina) para desarrollar el color. La reacción de color se terminó después de que la reacción continuara durante 10 minutos a temperatura ambiente mediante la adición de 25 µL de una solución de ácido sulfúrico 0,5 M a la mezcla de reacción. Luego se midió la absorbancia a 450 nm.

Como se muestra en la Figura 4, todos los clones de anticuerpos candidatos probados pueden reconocer y unirse a rh-PD-1 pero no a otros miembros de la familia CD28.

## Ejemplo 6. La secuencia de la región variable de los anticuerpos candidatos

- 55 Se cultivaron células de hibridoma candidatas hasta alcanzar un recuento total de 10<sup>7</sup>. Las células se recogieron mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos y se extrajo el ARN total de las células con el kit de reactivos Trizol (Invitrogen). El ARN total se utilizó como molde para sintetizar el ADNc de la primera hebra (Qiagen), que, a su vez, se usó como molde para amplificar la secuencia de ADN de la región variable de las células de hibridoma respectivas. La secuencia del cebador utilizada en la reacción de amplificación es complementaria a la primera región marco y la región constante de la región variable del anticuerpo (Larrick, JW, et al., (1990) Scand. J. Immunol., 32, 121-128 y Coloma, JJ., et al., (1991) BioTechniques, 11, 152-156 et al.,). En un sistema de reacción de 50 µL, se añadieron por separado 1 µL de ADNc, 5 µL de solución tampón de PCR 10 x, cada 1 µL (25 pmol) de cebador secuencia arriba y secuencia abajo, 1 µL de dNTP, 1 µL de 25 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 39 µL de H<sub>2</sub>O. La desnaturalización inicial de la plantilla se realizó a 95 °C durante 10 minutos. Se añadió 1 µL de enzima Taq (Invitrogen) a la reacción para iniciar los ciclos de temperatura de la amplificación por PCR. Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 58 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 115 minutos. El ciclo se repitió 30 veces antes de mantener la mezcla de reacción a 72 °C durante 10 minutos.

Se secuenció el producto amplificado y a continuación se muestran las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y cadena ligera del Clon 1, 10 y 11 del hibridoma:

Clon 1:

Cadena pesada

```

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QGQLQSGAELVRPGASVTLTCKASGYTFDDIYEMHWVKQTPIGHLEWIGGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <----FR4---->

KAKLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGTTGTTVTVSS

```

Secuencia de ácido nucleico

```

CAGGGTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGACCTGCAA
GGCTTCGGGCTACACATTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTATACATGGCCTGGAA
TGGATTGGAGTTATTGAATCTGAAACTGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAA
CTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCG
TCTATTACTGTACAAGAGAGGGTATTACTACGGTAGCAACTACGTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGG
CACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

```

Cadena ligera

```

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
DVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPELLIYKVYNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFOGSHVPFTTFGSGTKLEIK

```

Secuencia de ácido nucleico

```

GATGTTTTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGAG
ATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAG
TCTCCAGAGCTCCTGATCTACAAAGTTTACAACCGATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTGAGTGGCAGTG
GATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCT
TTCAAGGTTACATGTTCCATTACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAA

```

Clon 10:

Cadena pesada

```

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QVQLQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFDDIYEMHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGAAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <----FR4---->

KAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTREGITTSVVTYYWYFDVWGTTGTTVTVSS

```

Secuencia de ácido nucleico

CAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGTCCTGCAAGGC  
TTCGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGA  
TTGGAGCTATTGATCCTGAACTGGTGGTGTGCTGCCTACAATCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCATACTGACT  
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTA  
CTGTACAAGAGAGGGTATTACTACGTGAGTGGTTACGTACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGA  
CCACGGTCACCGTCTCCTCA

Cadena ligera

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2  
DVLMTQTPLSLPVS LGDQASIS CRSSQSIVHSNGNTYLEWY LQKPGQSPKLLIY KVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->  
GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEPEDLGVYYC FQGS HVPLT FGSGTKLEIK

Secuencia de ácido nucleico

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGACAG  
ATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAACACCTATTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGT  
CTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGG  
TCAGGGACAGATTTCACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGCCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCA  
AGGTTACATGTTCCACTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA

Clon 11:

Cadena pesada

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2  
QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSL TFGMGVG WIRQPSGKLEWLA HIWDDDKYYNPALKS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->  
RLTISKNTSKNQVFLKIANVDTEDTATYYCAR IEERFRWYFDV WGTGTTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico

CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTT  
CTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTTTGGTATGGGTGTCCGGCTGGATTCTGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGG  
AGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAATCCCGCCCTGAAGAGTCGGCTCACAAATC  
TCCAAGAATACCTCCAAAAACCAGGTATTCTCAAGATCGCCAATGTGGACACTGAAGATACTGCCACATA  
CTACTGTGCTCGAATAGAGGAGAGGTTCCGGCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCG  
TCTCCTCA

Cadena ligera

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2  
RAGWTQESALTTSPGETVTLT CRSSTGAITTSNYAN WVQEKPDHLFTGLI GGTNNRAP

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->  
GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFC ALWYSNHV VFGGGTKLTVL

Secuencia de ácido nucleico

AGGGCTGGTTGGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCACCTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTGCGCT  
 CAAGTACTGGGGCTATTACAACCTAGTAAGTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGATCATTTATTCAC  
 TGGTCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAGCTCCAGGTGTTCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGA  
 GACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGGCACAGACTGAGGATGAGGCAATATATTTCTGTGCTCTATGGT  
 ACAGCAACCACTGGGTGTTCTGGTGGAGGAACCAAACTGACTGTCCTA

#### Ejemplo 7. Construcción del vector de expresión del anticuerpo quimérico

5 El fragmento Fc de la región constante de la cadena pesada y la región constante  $\kappa/\lambda$  de la cadena ligera de las células de sangre humanas (Instituto de Sangre de Beijing) se clonaron en el plásmido pCDNA3.1 (véase Walls MA, Hsiao H y Harris LJ (1993), Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 12 2921-2929) para modificaciones. Dichos fragmentos de secuencia de cadena pesada y cadena ligera descritos en el Ejemplo 6 fueron sintetizados por Genscript Corporation. El fragmento de la secuencia de la cadena pesada, después de la digestión por las enzimas *XhoI* y *AgeI*, y el fragmento de la secuencia de la cadena ligera, después de la digestión por las enzimas *SmaI* y *DraIII*, se clonaron en el plásmido pCDNA3.1 y se secuenciaron para confirmar la secuencia del ADN clonado. Todos los materiales experimentales en la descripción siguiente se obtuvieron transfecando las células con esta serie de plásmidos y purificando los productos generados por las células transfectadas.

#### 15 Ejemplo 8. Estimulación *in vitro* de células T por anticuerpo quimérico: prueba de estimulación con toxina tetánica

Se colocaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién preparadas en una placa de fondo plano de 96 pozos. Después de incubación durante la noche, se añadieron varias concentraciones de anticuerpos y 100 ng/ml de toxina tetánica (TT) (List Biological Laboratories). Se recogió el sobrenadante de cada uno de los pozos de muestra tres días después. El contenido de IENy en el sobrenadante se midió mediante ELISA utilizando el kit INPNy (R&D Systems). Como se muestra en la Figura 5, después de que se bloquea la señal de PD-1, la secreción de citoquinas por las células inmunes activadas por la estimulación con TT aumentó significativamente. Además, los títulos de los anticuerpos candidatos son más altos que EH12.2H7, un anticuerpo descrito en la solicitud de patente china CN 200980147059.0 y adquirida a través de BioLegend Corporation.

#### 25 Ejemplo 9. Interacción de varios anticuerpos con PD-1 después del intercambio de las cadenas pesada y ligera del primero

30 Utilizando el método descrito en el Ejemplo 7, 10 se recombinaron recíprocamente las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos 1 y 10 para generar anticuerpos recombinantes H1L10 (cadena pesada 1, cadena ligera 10) y H10L1 (cadena pesada 10, cadena ligera 1). Estos anticuerpos, el anticuerpo original 1 (cadena pesada 1, cadena ligera 1) y el anticuerpo original 10 (cadena pesada 10, cadena ligera 10) se probaron mediante ELISA y los resultados de las EC<sub>50</sub> para estos anticuerpos se muestran en la siguiente tabla:

| Muestra               | H1L1  | H10L10 | H1L10 | H10L1 |
|-----------------------|-------|--------|-------|-------|
| EC <sub>50</sub> (pM) | 338,1 | 426,3  | 270,1 | 528,1 |

35 El resultado muestra que los anticuerpos producidos después de la recombinación todavía pueden unirse a la proteína PD-1 de manera eficaz.

#### 40 Ejemplo 10. Modificación de humanización del anticuerpo

La modificación de humanización se llevó a cabo con base en la secuencia de la región variable del anticuerpo secretada por la célula de hibridoma obtenida como se describió anteriormente. En resumen, el proceso de modificación de humanización implicó las siguientes etapas: A - comparar las secuencias de genes de los anticuerpos secretados por diversas células de hibridoma con la secuencia de genes del anticuerpo embrionario humano para encontrar la secuencia de alta homología; B - analizar y probar la afinidad de HLA-DR para seleccionar la secuencia marco del embrión humano con baja afinidad; C - usar tecnología analógica informática para aplicar acoplamiento molecular para analizar las secuencias de aminoácidos marco en la región variable y el entorno, y examinar su modo de unión estereo espacial; calcular la fuerza electrostática, la fuerza de Van der Waals, la hidrofobicidad-hidrofiliidad y el valor de entropía para analizar los aminoácidos individuales clave en las secuencias de genes de los anticuerpos secretados por diversas células del hibridoma, que son fundamentales para interactuar con PD-1 y mantener la configuración espacial de los anticuerpos, injertando estos aminoácidos clave de nuevo en el marco genético seleccionado del embrión humano. También se identificaron los sitios de aminoácidos en la región marco que deben reservarse y se sintetizaron cebadores aleatorios para construir la biblioteca de fagos. Luego se cribó la biblioteca de anticuerpos humanizados (Pini, A. et al., (1998). Design and Use of a Phage Display Library: HUMAN ANTIBODIES WITH SUBNANOMOLAR AFFINITY AGAINST A MARKER OF ANGIOGENESIS ELUTED FROM A TWO-DIMENSIONAL GEL, Journal of Biological Chemistry, 273 (34): 21769-21776). Se obtuvieron varios anticuerpos

humanizados del cribado, que incluyen los siguientes clones. Las secuencias de cadena ligera de los clones 38, 39 y 41 son las mismas, y las secuencias de cadena pesada de los clones 39 y 48 son las mismas.

Cadena pesada del clon 38

5

```

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDIYEMHWVRQAPIHGLEWIGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAREEGITTVATTYYWYFDVWGQGTTVTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCA
AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCCATCCACGGCCTGG
AGTGGATCGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCAGAGTG
ACCATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACAC
CGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGCATCACCACCGTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACGTG
TGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

```

10 Cadena ligera del clon 38

```

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC
CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC
CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC
AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGATTAT
TGCTTTAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAATGGAATTA

```

15

Cadena pesada del clon 39

```

<-----FR1-----> CDR1<----FR2-----> CDR2
QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDIYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <---FR4--->
RAKITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREEGITTVATTYYWYFDVWGQGTTVTVSS

```

20

```

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCA
AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCCGCCAGGGCCTG
GAGTGGATGGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCAGAG
CCAAGATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGAC
ACCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGGGCATCACCACCGTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACG
TGTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGAGCAGC

```

Cadena ligera del clon 39

```

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <--FR4-->
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

```

25

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC  
CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC  
CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC

AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGATTAT  
TGCTTTAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAAATTTAA

5 Cadena pesada del clon 41

<-----FR1-----> CDR1<-----FR2-----> CDR2  
QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETGGTAYNQKFG

<-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->  
RVTLTADKSSSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGQGTLLTVSS

CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCA  
AAGCGAGCGGCTATACCTTTACCGATTATGAAATGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG  
AATGGATGGGCGTGATTGAAAGCGAAACCGGCGGCACCGCGTATAACAGAAATTTAGGGCCGCGTG  
ACCTGACCGCGGATAAAAGCAGCAGCACCAGCGTATATGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACC  
GCGGTGTATTATGACCCGCGAAGGCATTACCACCGTGCGGACCACTATTATTGGTATTTGATGTGT  
GGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGC

10 Cadena ligera del clon 41

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2  
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIK

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC  
CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC  
CAGAGCCCGCAGCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC  
AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGATTAT  
TGCTTTAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACCTGGAAATTTAA

15 Cadena pesada del clon 48

<-----FR1-----> CDR1<-----FR2-----> CDR2  
QGQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGVIESETGGTAYNQKFKG

<-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->  
RAKITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTREGITTVATTYYWYFDVWGQGTLLTVSS

20 CAGGGCCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCCGGGCGCCAGCGTGAAAGTGAGCTGCA  
AGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCCCGGCCAGGGCCTG  
GAGTGGATGGGCGTGATCGAGAGCGAGACCGGCGGCACCGCCTACAACCAGAAAGTTCAAGGGCAGAG  
CCAAGATCACCGCCGACAAGAGCACCAGCACCAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGAC  
ACCGCCGTGTACTACTGCACCAGAGAGGGCATCACCACTGGCCACCACCTACTACTGGTACTTCGACG  
TGTGGGGCCAGGGCACCACTGACCGTGAGCAGC

Cadena ligera del clon 48

<-----FR1-----> CDR1 <-----FR2-----> CDR2  
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS

<-----FR3-----> CDR3 <-----FR4----->  
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIK

25

GATGTGGTGATGACCCAGAGCCCGCTGAGCCTGCCGGTGACCCTGGGCCAGCCGGCGAGCATTAGCTGC  
 CGCAGCAGCCAGAGCATTGTGCATAGCAACGGCAACACCTATCTGGAATGGTATCTGCAGAAACCGGGC  
 CAGAGCCCGCGCCTGCTGATTTATAAAGTGAGCAACCGCTTTAGCGGCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGC  
 AGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAAAATTAGCCGCGTGGAAGCGGAAGATGTGGGCGTGTATTAT  
 TGCTTTCAGGGCAGCCATGTGCCGCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAAACTGGAAATTA

#### 5 Ejemplo 11. Estimulación *in vitro* de células T mediante anticuerpo humanizado

Se colocaron PBMC recién preparadas (Instituto de Sangre de Beijing) en los pozos de una placa de fondo plano de 96 pozos. Después de una incubación durante la noche, se añadieron a las PBMC 10 µg/ml de anticuerpo y 100 ng/ml de toxina tetánica (TT). Después de cultivo durante 3 días, se recogió el sobrenadante y se midió el nivel de secreción de IL2 de los clones 38, 39, 41 y 48 (control (conIgG4)) de los anticuerpos humanizados utilizando Luminex® (Thermo Fisher Scientific, Inc.) y el kit de detección de ensayo de la citoquina CD8+ (EMD Millipore, Inc.). El resultado (véase la Figura 6) muestra que todos los anticuerpos humanizados pueden estimular las células T.

#### 15 Ejemplo 12. El anticuerpo humanizado puede estimular las células T para matar células tumorales *in vitro*

Se infectaron células MD-MAB-453 con el lentivirus (Qiagen) que expresa la proteína PD-L1 para generar una línea celular MD-MAB-453, que expresa de manera estable PD-L1. También se introdujo un gen GFP en dicha línea celular para permitir la expresión estable de la proteína GFP. Se cultivaron 300 células/pozo de células dendríticas (DC) aisladas de células de sangre periférica humana frescas con dichas células MD-MAB-453 que expresan de manera estable tanto PD-L1 como GFP (300 células/pozo) en una placa de 96 pozos juntas durante tres días. Se añadieron a la mezcla células T (1000 células/pozo) aisladas de sangre periférica humana y 10 µg/ml del anticuerpo anti-PD-1 humanizado Clones 38, 39, 41 o del anticuerpo de control clon 48 ("conIgG4") y se cultivaron juntas durante 3 días antes de que se midiera la fluorescencia de GFP. El resultado (véase la Figura 7) muestra que todos los anticuerpos humanizados pueden estimular las células T para matar las células tumorales.

#### 25 Ejemplo 13. La unión de anticuerpos humanizados con proteínas PD-1 derivadas de diversas especies

Se preparó 1 µg/ml de PD-1 de origen humano, PD-1 de *Macaca fascicularis* y PD-1 derivada de ratón (Sinobiological) en la solución tampón de carbonato (0,05 M pH9) y se utilizó para recubrir los pozos de las placas de fondo plano de 96 pozos a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, se retiró la solución de los pozos y estos se lavaron tres veces con un tampón de lavado. Se añadió una solución de PBS que contenía BSA al 3% para bloquear los pozos durante 20 minutos. A continuación, los pozos se lavaron tres veces con el tampón de lavado antes de que se añadieran 100 µL de diversas concentraciones de anticuerpos candidatos. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lavó tres veces con un tampón de lavado. En primer lugar se diluyó un anticuerpo de cabra antihumano conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch) a razón de 1:10000 con el tampón de lavado y luego se añadió a los pozos para incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces con el tampón de lavado, se añadieron 50 µL de solución de sustrato TMB a los pozos para desarrollar el color. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, se terminó la reacción de desarrollo de color con 25 µL de solución de ácido sulfúrico 0,5 M y se leyó la absorbancia a 450 nm. Los resultados (Figura 8A, B y C) muestran que todos los clones se unen a PD-1 de humanos o *Macaca fascicularis* con afinidad similar, pero no a PD-1 derivada de ratón.

Comparar las secuencias de PD-1 de humano, *Macaca fascicularis* y de ratón (véase la Figura 9 en la que se encuadran las principales regiones diferentes de PD-1 de ratón y PD-1 de humano/*Macaca fascicularis*). Los resultados experimentales han demostrado que el epítipo del anticuerpo candidato que se une a la proteína PD-1 existe en estas regiones.

#### 45 Ejemplo 14. Experimento de estimulación *in vitro* por anticuerpo humanizado para la proliferación de células T: experimento de respuesta de memoria al antígeno del tétanos

Se colocaron PBMC recién preparadas (Instituto de Sangre de Beijing) en los pozos de una placa de fondo plano de 96 pozos. Después de la incubación durante la noche, las células se marcaron con éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) y se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo humanizado (38, 39, 41 y 48) y 100 ng/ml de toxina tetánica (TT) (List Biological Laboratories). Se analizó la proliferación de células T al sexto, octavo y décimo día con base en la proporción de dilución de CFSE con citometría de flujo (FACS). Como se muestra en el resultado de la Figura 10, en comparación con la IgG de control, las células inmunes activadas por la estimulación con TT inducida mediante el bloqueo de la señal de PD-1 estaban bajo mayor división y proliferación.

#### 60 Ejemplo 15. Estimulación *in vitro* de la proliferación de células T mediante anticuerpo humanizado: experimento de respuesta de memoria al antígeno polipeptídico viral

Se colocaron PBMC recién preparadas (Instituto de Sangre de Beijing) en los pozos de una placa de fondo plano de 96 pozos. Después de una incubación durante la noche, las células se marcaron con CFSE. Se añadieron a los pozos 10 µg/ml de anticuerpo humanizado (38, 39, 41 y 48) y 1 µg/ml de mezcla de péptidos de CMV, EBV e Influenza ("CEF"). Se llevaron a cabo análisis cuantitativos sobre la proliferación de células T a los 6, 8 y 10 días con citometría de flujo (FACS) con base en la proporción de dilución de CSFE. Como se muestra en el resultado de la Figura 11, en comparación con la IgG de control, las células inmunes activadas por la estimulación de polipéptidos mixtos de CEF inducida mediante el bloqueo de la señal de PD-1 estaban bajo mayor división y proliferación.

OP140113-Listado de secuencias

<110> Shanghai Junshi Biosciences Inc.

<120> Anticuerpo anti-PD-1 y su uso

<130> 2013-06-26

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> La CDR1 de cadena pesada del Clon 1

<400> 1

**Asp Tyr Glu Met His**  
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> La CDR2 de cadena pesada del Clon 1

<400> 2

**Val Ile Glu Ser Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys**  
1 5 10 15

**Gly**

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> La CDR3 de cadena pesada del Clon 1

<400> 3

**Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val**  
1 5 10 15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> La CDR1 cadena ligera del Clon1

<400> 4

**Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu**  
1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> La CDR2 de cadena ligera del Clon1

<400> 5

Lys Val Tyr Asn Arg Phe Ser  
 1 5

5 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> La CDR3 de cadena ligera del Clon 1  
 <400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr  
 1 5

10 <210> 7  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> La CDR1 de cadena pesada del Clon 10  
 15 <400> 7

Asp Tyr Glu Met His  
 1 5

20 <210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> La CDR2 de cadena pesada del Clon10  
 <400> 8

Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ala Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

25 Gly

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 30 <213> La CDR3 de cadena pesada del Clon 10  
 <400> 9

Glu Gly Ile Thr Thr Ser Val Val Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10 15

35 <210> 10  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> La CDR1 de cadena ligera del Clon 10  
 <400> 10

40 -

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu  
 1 5 10 15

<210> 11  
 <211> 7  
 45 <212> PRT  
 <213> La CDR2 de cadena ligera del Clon 10  
 <400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

50 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> La CDR3 de cadena ligera del Clon 10  
 55 <400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr  
 1 5

5 <210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> La CDR1 de cadena pesada del Clon 11  
 <400> 13

Thr Phe Gly Met Gly Val Gly  
 1 5

10 <210> 14  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 15 <213> La CDR2 de cadena pesada del Clon 11  
 <400> 14

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

20 <210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> La CDR3 de cadena pesada del Clon 11  
 <400> 15

25 Ile Glu Glu Arg Phe Arg Trp Tyr Phe Asp Val  
 1 5 10

30 <210> 16  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> La CDR1 de cadena ligera del Clon 11  
 <400> 16

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Ile Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn  
 1 5 10

35 <210> 17  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> La CDR2 de cadena ligera del Clon 11  
 40 <400> 17

Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro  
 1 5

45 <210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> La CDR3 de cadena ligera del Clon 11  
 <400> 18

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val  
 1 5

50 <210> 19  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 55 <213> La región variable de cadena pesada del Clon 1  
 <400> 19

# ES 2 822 927 T3

Gln Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Ile His Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Glu Ser Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

5

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> La región variable de cadena ligera del Clon 1

10

<400> 20

# ES 2 822 927 T3

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 Ser 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 Glu Leu Leu Ile Tyr Lys Val Tyr Asn Arg Phe 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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 21

<211> 125

5 <212> PRT

<213> La región variable de cadena pesada del Clon 10

<400> 21

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ala Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

10

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Glu Gly Ile Thr Thr Ser Val Val Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 22  
<211> 112  
<212> PRT

5 <213> La región variable de la cadena ligera del Clon 10

<400> 22

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 Ser 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 Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Pro Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

10

<210> 23  
<211> 121  
<212> PRT

<213> La región variable de la cadena pesada del Clon 11

15

<400> 23

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln  
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe

# ES 2 822 927 T3

|                                                                 |     |     |     |  |    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|--|----|
|                                                                 | 20  |     | 25  |  | 30 |
| Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu | 35  | 40  | 45  |  |    |
| Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ala | 50  | 55  | 60  |  |    |
| Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asn Thr Ser Lys Asn Gln Val | 65  | 70  | 75  |  | 80 |
| Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr | 85  | 90  | 95  |  |    |
| Cys Ala Arg Ile Glu Glu Arg Phe Arg Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly | 100 | 105 | 110 |  |    |
| Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser                             | 115 | 120 |     |  |    |

<210> 24  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> La región variable de la cadena ligera del Clon 11  
 <400> 24

|                                                                 |     |     |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|----|----|
| Arg Ala Gly Trp Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu | 1   | 5   | 10 | 15 |
| Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Ile Thr Thr Ser | 20  | 25  | 30 |    |
| Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly | 35  | 40  | 45 |    |
| Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe | 50  | 55  | 60 |    |
| Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala | 65  | 70  | 75 | 80 |
| Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn | 85  | 90  | 95 |    |
| His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu             | 100 | 105 |    |    |

<210> 25  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> La región variable de cadena pesada del Clon 1

# ES 2 822 927 T3

<400> 25

```
cagggtcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg      60
acctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca      120
cctatacatg gcctggaatg gattggagtt attgaatctg aaactggtgg tactgcctac      180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac      240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagagaggggt      300
attactacgg tagcaactac gtactactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg      360
gtcaccgtct cctca                                                    375
```

5

<210> 26

<211> 336

<212> ADN

<213> La región variable de cadena ligera del Clon 1

<400> 26

10

```
gatgttttga tgaccagac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccagag ctctgatct acaaagtta caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttcca      300
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa                            336
```

<210> 27

<211> 375

<212> ADN

<213> La región variable de cadena pesada del Clon 10

<400> 27

15

```
caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg      60
tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca      120
cctgtgcatg gcctggaatg gattggagct attgatcctg aaactggtgg tgctgcctac      180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac      240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagagaggggt      300
attactacgt cagtggttac gtactactgg tacttcgatg tctggggcac agggaccacg      360
gtcaccgtct cctca                                                    375
```

20

<210> 28

<211> 336

<212> ADN

<213> La región variable de cadena ligera del Clon 10

<400> 28

25

# ES 2 822 927 T3

```

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg      120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc      240
agcagagtgg agcctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcca      300
ctcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa                                336

```

<210> 29  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> La región variable de cadena pesada del Clon 11  
 <400> 29

```

caggttactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg      60
acttgttctt tctctggggtt ttcactgagc acttttggtg tgggtgtcgg ctggattcgt      120
cagccttcag ggaagggtct ggagtggctg gcacacattt ggtgggatga tgataagtac      180
tataatcccg ccctgaagag tcggctcaca atctccaaga atacctcaa aaaccaggta      240
ttcctcaaga tcgccaatgt ggacactgaa gatactgcca catactactg tgctogaata      300
gaggagaggt tccgctggta ctctgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc      360
tca                                                                    363

```

<210> 30  
 <211> 327  
 <212> ADN  
 <213> La región variable de cadena ligera del Clon 11  
 <400> 30

```

agggctgggt ggactcagga atctgcactc accacatcac ctgggtgaaac agtcacactc      60
acttgctcgt caagtactgg ggctattaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa      120
aaaccagatc atttattcac tgggtctaata ggtggtacca acaaccgagc tccaggtggt      180
cctgccagat tctcaggctc cctgattgga gacaaggctg ccctcaccat cacaggggca      240
cagactgagg atgaggcaat atatttctgt gctctatggt acagcaacca ctgggtgttc      300
ggtggaggaa ccaaactgac tgtccta                                        327

```

<210> 31  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Cebador directo  
 <400> 31  
 gtacgctagc cacatgcag atccacagg c 31

<210> 32  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Cebador inverso  
 <400> 32  
 gatcctcgag ccaccagggt ttggaactg 29

<210> 33  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> La región variable de cadena pesada del Clon 38

# ES 2 822 927 T3

<400> 33

Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Ile His Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Val Ile Glu Ser Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

- 5 <210> 34
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> La región variable de cadena ligera del Clon 38, 39, y 41
- <400> 34

10

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser 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 Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 35

<211> 125

<212> PRT

<213> La región variable de cadena pesada del Clon 39 y 48

<400> 35

Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Val Ile Glu Ser Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Lys Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 36

<211> 125

<212> PRT

<213> La región variable de cadena pesada del Clon 41

## ES 2 822 927 T3

<400> 36

Gln Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Val Ile Glu Ser Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Thr Arg Glu Gly Ile Thr Thr Val Ala Thr Thr Tyr Tyr Trp Tyr Phe  
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

5 <210> 37  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> La región variable de cadena ligera del Clon 48  
<400> 37

10

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser 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 Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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

-

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 38

<211> 375

5 <212> ADN

<213> la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada del Clon 38

<400> 38

cagggccagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaagggtg 60  
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacgaga tgcactgggt gagacaggcc 120  
cccatccacg gcctggagtg gatcggcggtg atcgagagcg agaccggcgg caccgcctac 180  
aaccagaagt tcaagggcag agtgaccatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240  
atggagctga gcagcctgag aagcggaggac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc 300  
atcaccaccg tggccaccac ctactactgg tacttcgacg tgtggggcca gggcaccacc 360  
gtgaccgtga gcagc 375

10

<210> 39

<211> 336

<212> ADN

<213> la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera del Clon 38, 39, y 41

15

<400> 39

gatgtggtga tgaccagag cccgctgagc ctgccggtga ccctgggcca gccggcgagc 60  
attagctgcc gcagcagcca gagcattgtg catagcaacg gcaacaccta tctggaatgg 120  
tatctgcaga aaccgggcca gagcccgag ctgctgattt ataaagtgag caaccgcttt 180  
agcggcgctgc cggatcgctt tagcggcagc ggcagcggca ccgattttac cctgaaaatt 240  
agccgcgtgg aagcgggaaga tgtgggcgtg tattattgct ttcagggcag ccatgtgccg 300  
ctgacctttg gccagggcac caaactggaa attaaa 336

20

<210> 40

<211> 375

<212> ADN

<213> la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada del clon 39 y 48

<400> 40

cagggccagc tgggtgcagag cggcgccgag gtgaagaagc ccggcgccag cgtgaagggtg 60  
agctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gactacgaga tgcactgggt gagacaggcc 120  
cccgccagc gcctggagtg gatgggcgtg atcgagagcg agaccggcgg caccgcctac 180

25

aaccagaagt tcaagggcag agccaagatc accgccgaca agagcaccag caccgcctac 240  
atggagctga gcagcctgag aagcgaggac accgccgtgt actactgcac cagagagggc 300  
atcaccaccg tggccaccac ctactactgg tacttcgacg tgtggggcca gggcaccacc 360  
gtgaccgtga gcagc 375

<210> 41

<211> 375

<212> ADN

<213> la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada del Clon 41

<400> 41

cagggccagc tgggtgcagag cggcgcgga gtgaaaaaac cgggcgcgag cgtgaaagtg 60  
agctgcaaag cgagcggcta tacctttacc gattatgaaa tgcattgggt gcgccaggcg 120  
ccgggccagg gcctggaatg gatgggcgtg attgaaagcg aaaccggcgg caccgcgtat 180  
aaccagaaat ttcagggccg cgtgaccctg accgcggata aaagcagcag caccgcgtat 240  
atggaactga gcagcctgcg cagcgaagat accgcgggtgt attattgcac ccgcgaaggc 300  
attaccaccg tggcgaccac ctattattgg tattttgatg tgtggggcca gggcaccctg 360  
gtgaccgtga gcagc 375

<210> 42

<211> 336

<212> ADN

<213> la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera del Clon 48

<400> 42

gatgtggtga tgaccagag cccgctgagc ctgccggtga ccctgggcca gccggcgagc 60  
attagctgcc gcagcagcca gagcattgtg catagcaacg gcaacaccta tctggaatgg 120  
tatctgcaga aaccgggcca gagcccgcg cgtctgattt ataaagttag caaccgcttt 180  
agcggcgtgc cggatcgctt tagcggcagc ggcagcggca ccgattttac cctgaaaatt 240  
agccgcgtgg aagcgggaaga tgtgggcgtg tattattgct ttcagggcag ccatgtgccg 300  
ctgacctttg gccagggcac caaactggaa attaaa 336

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región de cadena pesada variable que consiste en la SEQ ID NO: 33 y una región de cadena ligera variable que consiste en la SEQ ID NO: 34.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Un vector de expresión, que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Una célula huésped, que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 3.
- 15 5. Un método para producir el anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que el método comprende: cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4 bajo condiciones que permitan la producción del anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo así producido.
- 20 6. Un inmunoconjugado, que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 acoplado con un agente terapéutico, en el que el agente terapéutico es una toxina, radioisótopo, fármaco o agente citotóxico.
7. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo farmacéutico.
- 25 8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método para prevenir o tratar enfermedades o afecciones mediante la eliminación, inhibición o disminución de la actividad de PD-1, en el que las enfermedades o afecciones son cánceres.

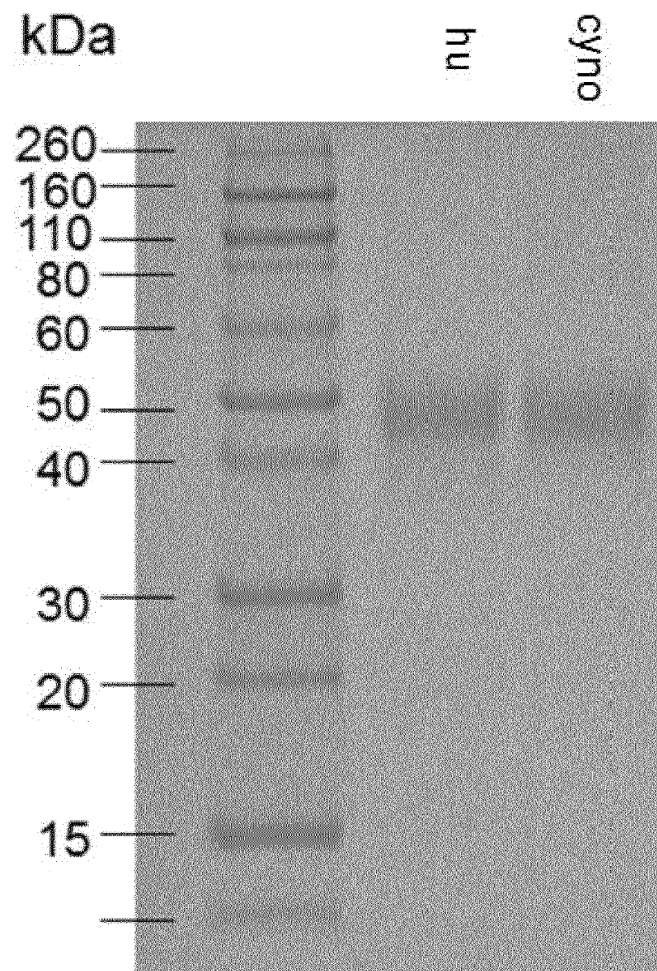


FIG. 1

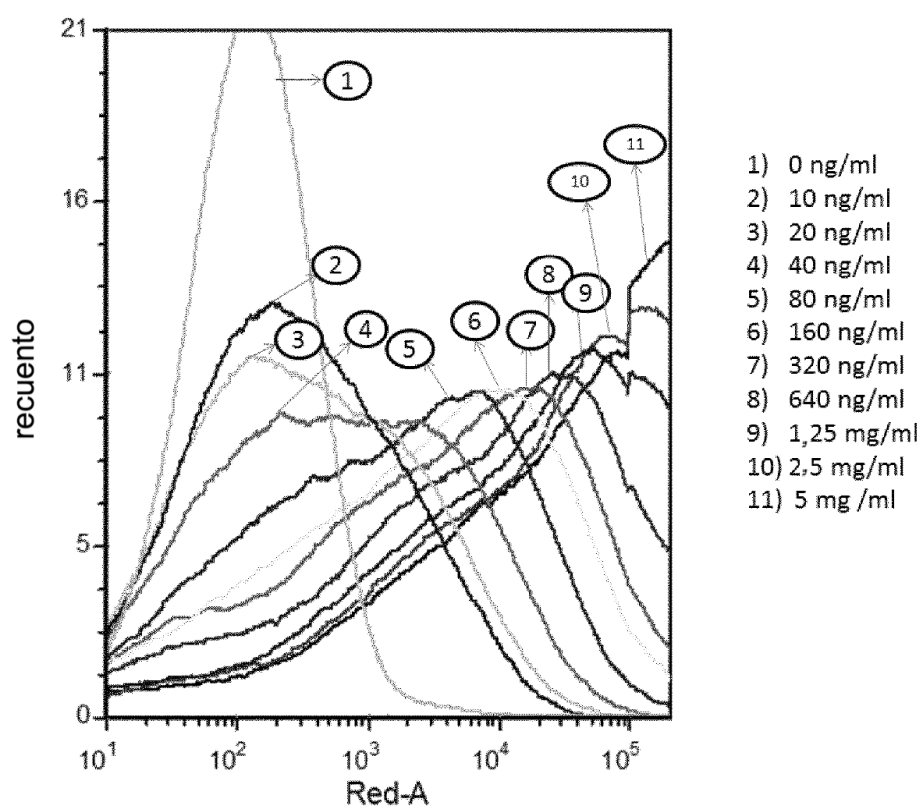


FIG. 2

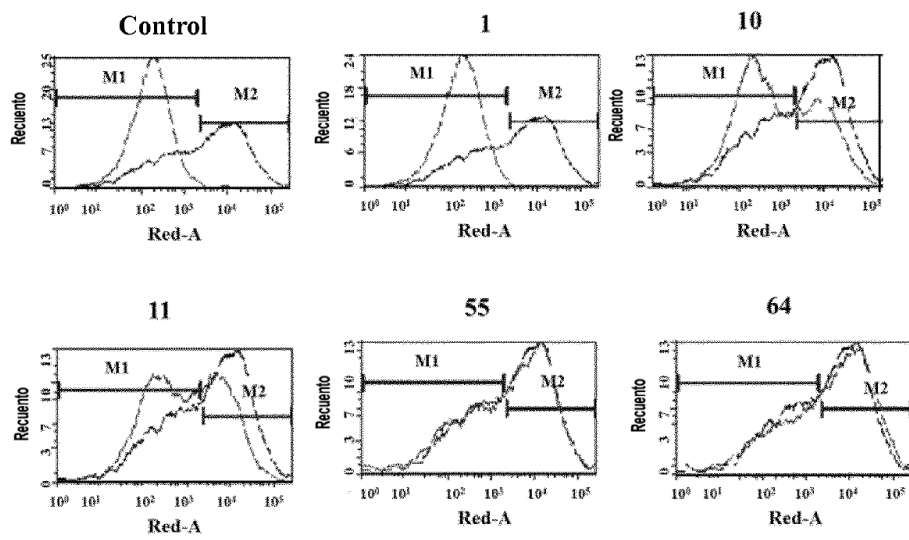


FIG. 3

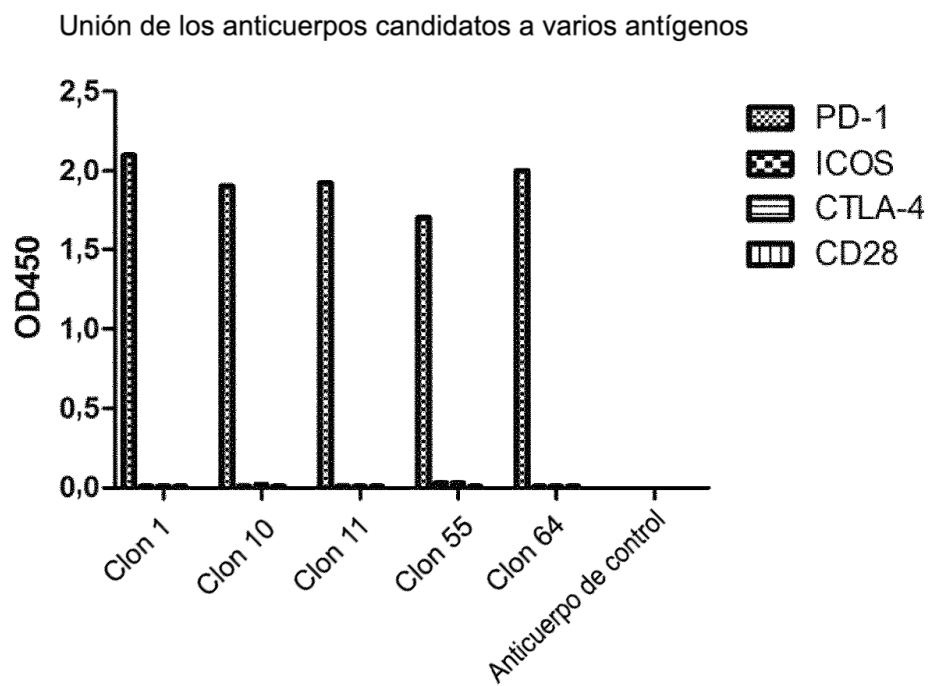


FIG. 4

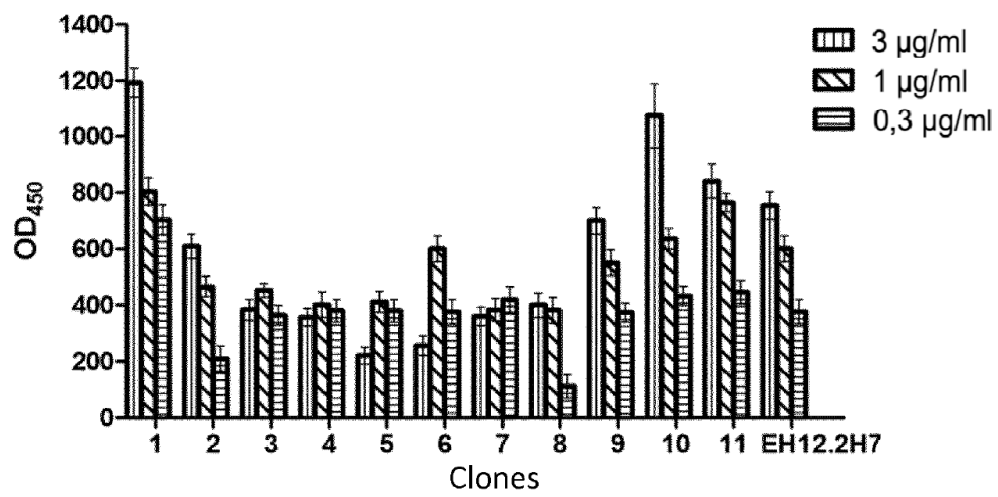


FIG. 5

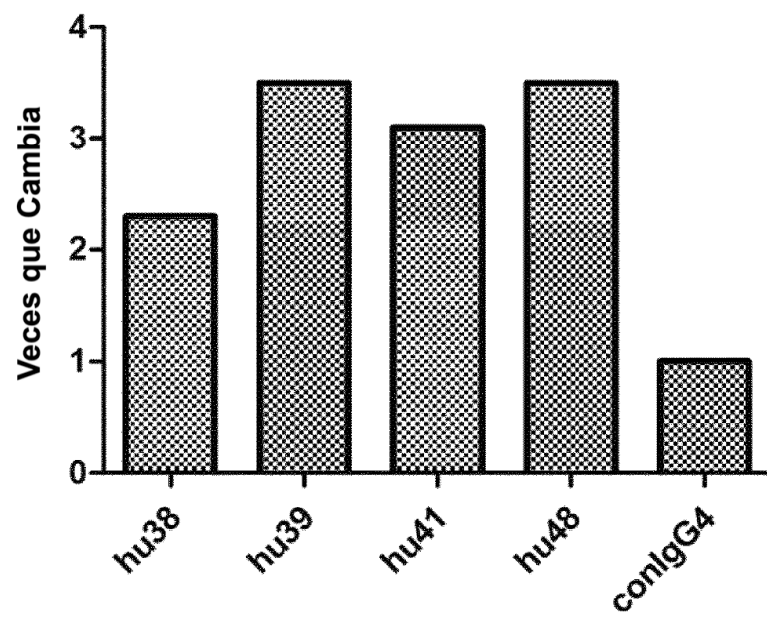


FIG. 6

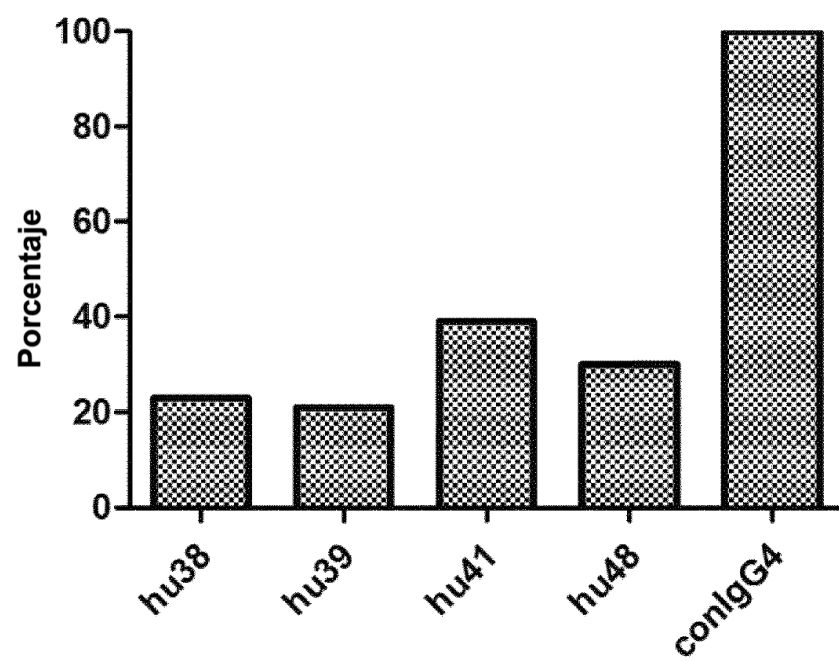
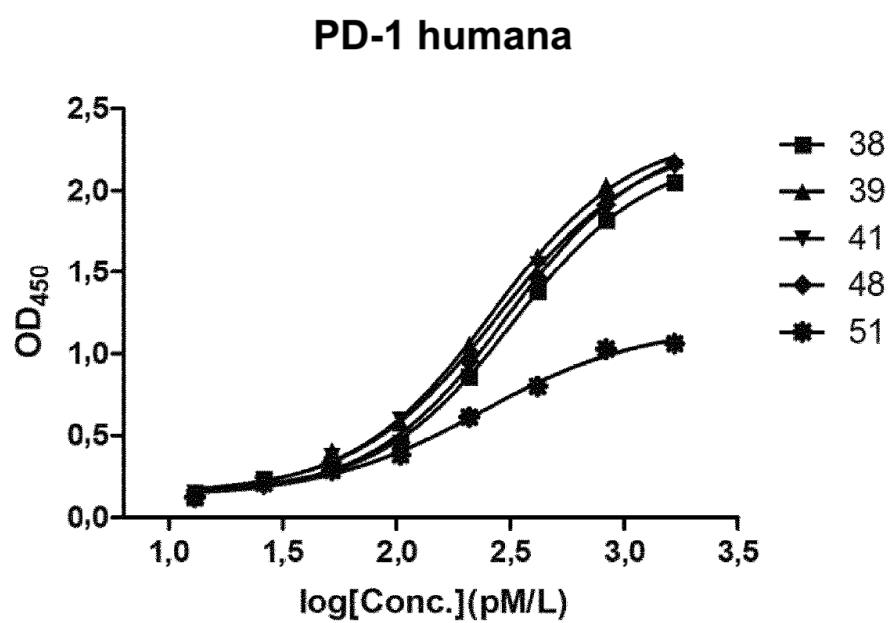
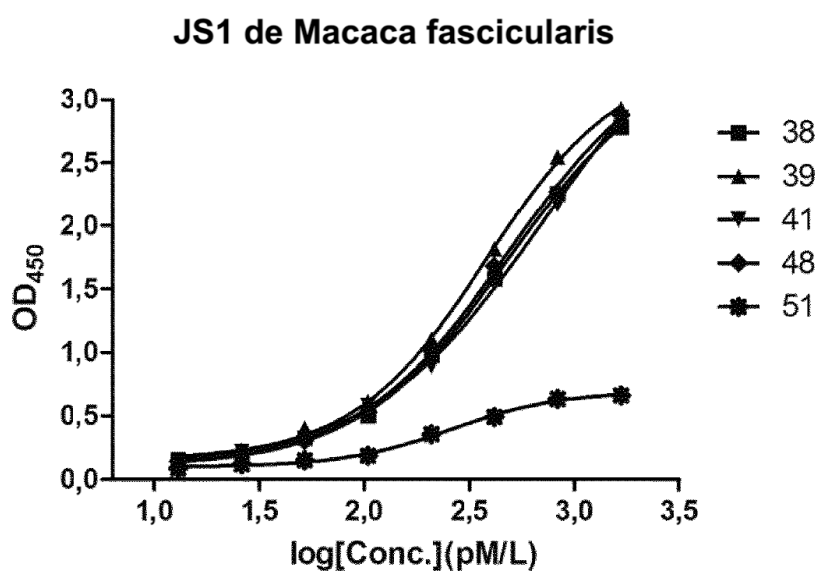


FIG. 7



|                               |       |       |       |       |       |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| NO.                           | 38    | 39    | 41    | 48    | 51    |
| $\text{EC}_{50}(\text{pM/L})$ | 326,1 | 262,9 | 279,6 | 310,9 | 236,5 |

FIG. 8A



| NO.                     | 38    | 39    | 41    | 48    | 51    |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| EC <sub>50</sub> (pM/L) | 488,8 | 381,9 | 724,8 | 485,3 | 259,9 |

FIG. 8B

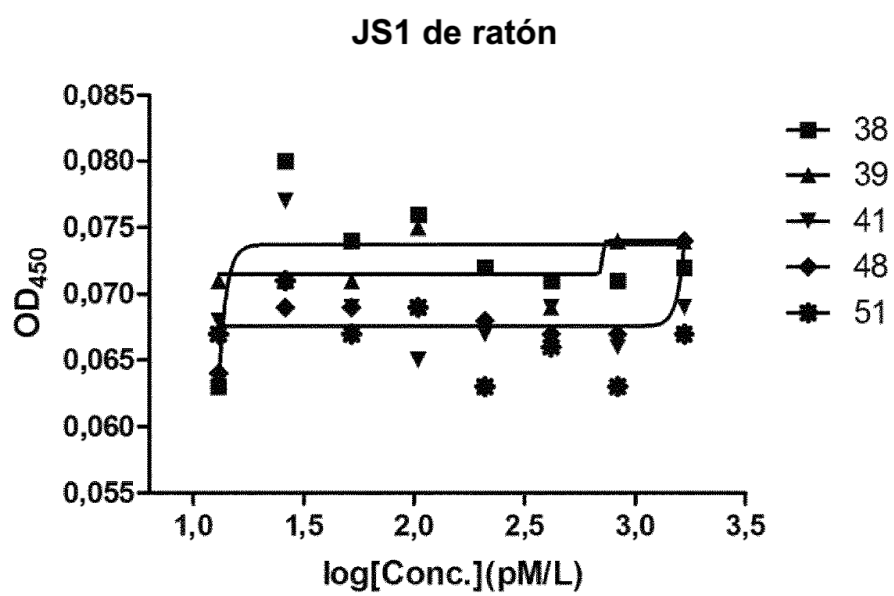
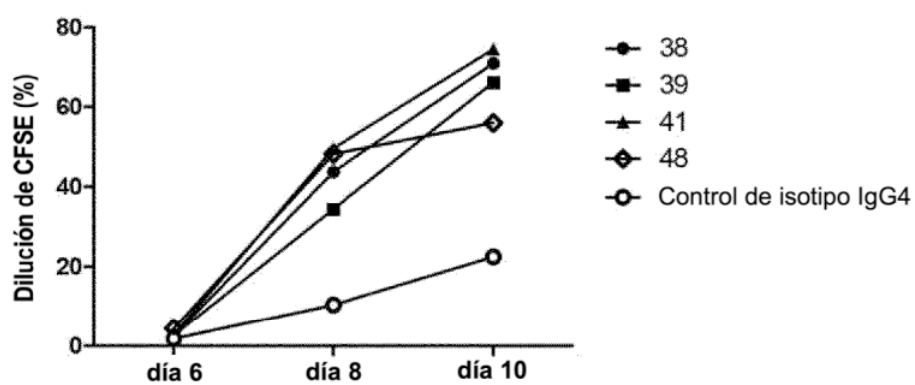
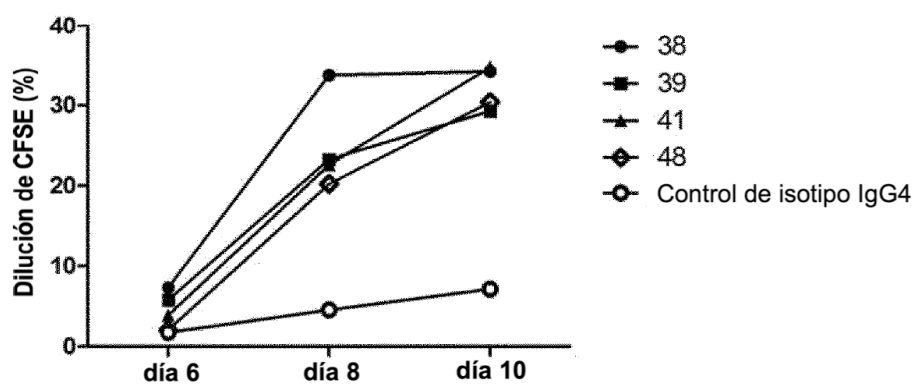


FIG. 8C

1  
 Humano (1) M Q I P Q A P W P V V W A V L Q L G W R P G W F L D S P D R P W N P P T F S P A L L V V T E G D N A 50  
 Cyno (1) M Q I P Q A P W P V V W A V L Q L G W R P G W F L E S P D R P W N A P T F S P A L L I V T E G D N A  
 Rátón (1) M W V R Q V P W S F I T W A V L Q L S W Q S G W L L E V P N G P W R S L I F Y P A W L I V S E G A M A  
 51  
 Humano (51) T F T C S F S N T S E S F V L N W Y R M S P S N Q T D K L A A F P E D R S Q P G Q D C R F R V T Q L 100  
 Cyno (51) T F T C S F S N T S E S F V L N W Y R M S P S N Q T D K L A A F P E D R S Q P G Q D C R F R V T Q L  
 Rátón (51) T F T C S L S N W S E S L M L N W N Y L S P S N Q T E L Q A A F C N G L S Q P V Q D A R F Q I I Q L  
 101  
 Humano (101) P N G R D F H M S V V R A R R N D S C T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V T E R R A E 150  
 Cyno (101) P N G R D F H M S V V R A R R N D S G T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V T E R R A E  
 Rátón (101) P N R H D F H M N I L D T R R N D S G I Y L C G A I S L H P K A K I E E S P G A E L V V T E E I L  
 151  
 Humano (151) V P T A H P S P S P R P A G Q F Q T L V V G V V G G L L G S - - L V L L V V W L V A V I C S R A A R G 200  
 Cyno (151) V P T A H P S P S P R P A G Q F Q A L V V G V V G G L L G S - - L V L L V V W L V A V I C S R A A Q G  
 Rátón (151) T S T R Y P S P S P K P E G R F Q G M V I G I M S A L V G I P V L L L L A W A L A V F C S T S M S E  
 201  
 Humano (199) T I G A R R T G Q P L K E D P S A V P V F S V D Y G E I D F Q W R E K T P E P P A P C V P E Q T E Y 250  
 Cyno (199) T I E A R R T G Q P L K E D P S A V P V F S V D Y G E L D F Q W R E K T P E P P A P C V P E Q T E Y  
 Rátón (201) A R G A G S K D D T L K E E P S A A P C P S V A Y E E L D F G G R E K T P E L P T A C V - - H T E Y  
 251 280  
 Humano (249) A T I V F P S G M G T S S P A R R G S A D G P R S A G P L R P E D G H C S W P L  
 Cyno (249) A T I V F P S G L G T S S P A R R G S A D G P R S P L R P E D G H C S W P L  
 Rátón (249) A T I V F T E G L G S A M G R R G S A D G L Q G R P R P R H R D G H C S W P L

**FIG. 9**

**Proliferación de células T que recuerdan el toxoide tetánico****FIG. 10**

**Proliferación de células T que recuerdan al péptido CEF****FIG. 11**