

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 478**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (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: **11.08.2016 PCT/CN2016/094624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2017 WO17025051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2016 E 16834675 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3334763**

54 Título: **Nuevos anticuerpos anti-PD-1**

30 Prioridad:

11.08.2015 WO PCT/CN2015/086594

19.01.2016 WO PCT/CN2016/071374

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2024

73 Titular/es:

WUXI BIOLOGICS IRELAND LIMITED (100.0%)
One Spencer Dock, North Wall Quay
Dublin 1, IE

72 Inventor/es:

ZHENG, YONG;
LI, JING y
CHEN, ZHISHENG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 992 478 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

Nuevos anticuerpos anti-PD-1

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente divulgación se refiere en general a anticuerpos anti-PD-1.

FONDO

10

15

20

25

30

[0002] Cada vez más evidencias de resultados preclínicos y clínicos han demostrado que dirigirse a los puntos de control inmunitarios se está convirtiendo en el enfoque más prometedor para tratar a pacientes con cáncer. La muerte celular programada 1, una de las proteínas del punto de control inmunitario, desempeña un papel fundamental en la limitación de la actividad de las células T, que proporcionan un importante mecanismo de resistencia inmunitaria mediante el cual las células tumorales escapan a la vigilancia inmunitaria. La interacción de PD-1, expresada en las células T activadas, y PD-L1, expresado en las células tumorales, regula negativamente la respuesta inmunitaria y frena la inmunidad antitumoral. La expresión de PD-L1 en los tumores se correlaciona con una menor supervivencia en los cánceres de esófago, páncreas y otros tipos de cáncer, lo que destaca esta vía como una nueva diana prometedora para la inmunoterapia tumoral. Las compañías farmacéuticas, como Bristol-Myers Squibb (BMS), Merck, Roche y GlaxoSmithKline (GSK), han desarrollado múltiples agentes dirigidos a la vía PD-1. Los datos de los ensayos clínicos demostraron pruebas tempranas de actividad clínica duradera y un perfil de seguridad alentador en pacientes con diversos tipos de tumores. El nivolumab, un fármaco PD-1 desarrollado por BMS, se está situando en el centro del campo de la próxima generación. Ahora, en 6 estudios de fase avanzada, el tratamiento estimuló la reducción tumoral en tres de los 5 grupos de cáncer estudiados, incluido el 18% de 72 pacientes con cáncer de pulmón, cerca de un tercio de 98 pacientes con melanoma y el 27% de 33 pacientes con cáncer de riñón. Desarrollado por Merck, el lambrolizumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 totalmente humano que actúa contra la PD-1, que obtuvo la designación de nuevo avance de la FDA tras la presentación de impresionantes datos de IB para el cáncer de piel. Los resultados de un estudio de fase IB han mostrado una respuesta antitumoral objetiva en el 51% de 85 pacientes con cáncer, y una respuesta completa en el 9% de los pacientes. El MPDL3280A experimental de Roche demostró su capacidad para reducir el tamaño de los tumores en 29 de 140 (21%) pacientes con cáncer avanzado y tumores de diversos tamaños.

[0003] Ohaegbulam K.C. et al., Trends in Molecular Medicine, 21. 24-33 (2015) es un artículo de revisión sobre la inmunoterapia del cáncer humano con anticuerpos contra la vía PD-1 y PD-L1.

35

[0004] Sin embargo, es posible que las terapias existentes no sean del todo satisfactorias, por lo que siguen siendo necesarios nuevos anticuerpos anti-PD-1.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

40

[0005] La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales anti-PD-1 (en particular anticuerpos totalmente humanos), polinucleótidos que codifican los mismos, métodos de uso de los mismos, kits o composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos anti-PD-1, y los anticuerpos anti-PD-1 para su uso en terapia.

45

[0006] La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

50

[0007] En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende: a) una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID N.º: 53 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID N.º: 55; o b) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 53 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID N.º: 67.

55

[0008] En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tienen una función efectora sustancialmente reducida. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos no median ADCC o CDC o ambas.

[0009] En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento se unen a un epítipo que comprende al menos uno de los siguientes residuos de aminoácidos de PD-1: V64, P83, D85, L128, A129, P130, K131, A132 y Q133.

60

[0010] En ciertas realizaciones, los anticuerpos aquí proporcionados son anticuerpos monoclonales, anticuerpos totalmente humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos recombinantes, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos marcados, anticuerpos bivalentes o anticuerpos antiidiotípicos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos monoclonales totalmente humanos, producidos opcionalmente por una rata transgénica, por ejemplo, una rata transgénica que tenga inactivada la expresión endógena de los genes de inmunoglobulina de rata y sea portadora de loci de inmunoglobulina humana recombinante con delección J-loca y una mutación C-kappa.

65

[0011] En ciertas realizaciones, los fragmentos de unión a antígeno proporcionados en el presente documento son un diacuerpo, un scFv, un dímero de scFv, un BsFv, un dsFv, un (dsFv)₂, un dsFv-dsFv', un fragmento Fv, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, o un diacuerpo ds.

[0012] En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos aquí proporcionados comprenden además una región constante de inmunoglobulina.

[0013] En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento, comprenden además un conjugado.

[0014] En ciertas realizaciones, el conjugado puede ser una marcación detectable, una fracción modificadora farmacocinética o una fracción de purificación.

[0015] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos del primer aspecto. En ciertas realizaciones, se proporcionan vectores que comprenden estos polinucleótidos, y en otras realizaciones, se proporcionan células huésped que comprenden estos vectores. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para expresar uno o más de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento mediante el cultivo de estas células huésped en condiciones en las que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno codificados por los polinucleótidos se expresan a partir de un vector. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos proporcionados en el presente documento se asocian de forma operable con un promotor, como un promotor SV40 en un vector. En ciertas realizaciones, las células huésped que comprenden los vectores aquí proporcionados son células de ovario de hámster chino o células 293F.

[0016] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona kits que comprenden el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto.

[0017] Los anticuerpos PD-1 proporcionados en el presente documento, como los anticuerpos hAb 1.103.11, hAb 1.103.11-v2, o los otros anticuerpos hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.139.15, y hAb 1.153.7 descritos en el presente documento con fines ilustrativos tienen buena tolerabilidad y alta actividad antitumoral *in vivo* en un animal. Por ejemplo, un animal con células tumorales administrado con los anticuerpos PD-1 proporcionados en el presente documento tiene una reducción del volumen tumoral de al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% en comparación con el animal de control con un volumen tumoral basal similar pero administrado solo con vehículo.

[0018] Cualquier referencia a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción debe interpretarse como una referencia a los compuestos, composiciones farmacéuticas y/o medicamentos de la presente invención para su uso en métodos de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o diagnóstico).

[0019] Se describen en el presente documento métodos para tratar una afección asociada con PD-1 en un individuo, que comprenden: administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en el presente documento. El individuo puede haber sido identificado como portador de un trastorno o una afección susceptible de responder a un antagonista de PD-1. El individuo puede haber sido identificado como positivo para la presencia o el nivel elevado del PD-L1 en una muestra biológica de prueba del individuo.

[0020] En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. En algunas de estas realizaciones, los portadores farmacéuticos pueden ser, por ejemplo, diluyentes, antioxidantes, adyuvantes, excipientes o sustancias auxiliares no tóxicas.

[0021] En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo del primer aspecto para su uso en el tratamiento de un cáncer o infección viral crónica en un sujeto que se beneficiaría de la regulación positiva de la respuesta inmunitaria, opcionalmente en el que el sujeto tiene expresión de regulación positiva de PD-L1.

[0022] En el presente documento se describen además métodos para tratar una afección en un sujeto que se beneficiaría de la regulación positiva de la respuesta inmunitaria, que comprenden la administración al sujeto de una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en el presente documento. El sujeto puede tener una expresión de regulación positiva de PD-L1, o puede haber sido identificado como positivo para la expresión de PD-L1.

[0023] En el presente documento se describe además un uso del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar una afección que se beneficiaría de la regulación positiva de la respuesta inmunitaria. Puede tratarse de un cáncer o de una infección vírica crónica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0024]

La Figura 1 presenta la unión de anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos a células CHO que expresan PD-1, medida mediante análisis FACS.

La Figura 2 presenta la unión de anticuerpos PD-1 totalmente humanos a células CHO que expresan PD-1 con una EC50 de aproximadamente 2nM medida mediante análisis FACS.

La Figura 3 muestra la unión del anticuerpo anti-PD-1 totalmente humano a PD-1 expresada en células CD4+T activadas, medida mediante análisis FACS.

La Figura 4 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos bloquearon la unión de PD-L1 a las células CHO transfectadas con PD-1 con IC50 de aproximadamente 3-8 nM según lo medido por análisis FACS.

La Figura 5 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos se unen específicamente a PD-1, pero no se unen a los miembros de la familia CD28 y CTLA4, según se midió mediante análisis FACS.

La Figura 6 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos contra PD-1 se unen a PD-1 de mono cynomolgus pero no a PD-1 murina.

La Figura 7 muestra la cinética completa de la afinidad de unión de los anticuerpos PD-1 a la PD-1 humana, que oscila entre 3,76E-9 y 1,76E-10 mol/L, determinada por resonancia de plasmón de superficie.

La Figura 8 ilustra el efecto de los anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos sobre la producción de IL-2 en la reacción de linfocitos mezclados (MLR).

La Figura 9 ilustra el efecto de los anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos sobre la producción de IFN γ en la MLR.

La Figura 10 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos promovieron la proliferación de células T en la MLR.

La Figura 11 muestra que los anticuerpos PD-1 totalmente humanos promovieron la proliferación de células T en la respuesta específica de células T.

La Figura 12 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 revirtieron la función supresora de las Treg.

La Figura 13 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 carecían de ADCC en células T activadas.

La Figura 14 muestra que los anticuerpos anti-PD-1 carecían de CDC en células T activadas.

La Figura 15 muestra que los hAb 1.103.11-v2 en diferentes tampones se unen al dominio extracelular de PD-1 humana con afinidad similar medida por ELISA. "hAb 1.103.11-v2 en tampón" se refiere al anticuerpo en el tampón de formulación, y "hAb 1.103.11-v2 en PBS" se refiere al anticuerpo en el 1xPBS, pH 7,4.

La Figura 16 muestra que los hAb 1.103.11-v2 en diferentes tampones se unen a la célula CHO que expresa PD-1 con afinidad similar medida por FACS. "hAb 1.103.11-v2 en tampón" se refiere al anticuerpo en el tampón de formulación, y "hAb 1.103.11-v2 en PBS" se refiere al anticuerpo en el 1xPBS, pH 7,4.

La Figura 17 muestra los residuos en un área pequeña (área sombreada) en la estructura cristalina del PD-L1 humano a los que se unen los anticuerpos. A muestra los residuos de área pequeña comunes; B-D muestra los residuos de área pequeña para hAb 1.103.11, Keytruda y hAb 11.148.10, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0025] La siguiente descripción de la divulgación pretende simplemente ilustrar diversas realizaciones de la divulgación.

Definiciones

[0026] El término "anticuerpo", tal como se utiliza aquí, incluye cualquier inmunoglobulina, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo multiespecífico o anticuerpo biespecífico (bivalente) que se une a un antígeno específico. Un anticuerpo nativo intacto consta de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada consta de una región variable y una primera, segunda y tercera región constantes, mientras que cada cadena ligera consta de una región variable y una región constante. Las cadenas pesadas de mamíferos se clasifican en α , δ , ϵ , γ y μ , y las cadenas ligeras de mamíferos en λ o κ . El anticuerpo tiene forma de "Y", con el tallo de la Y formado por la segunda y tercera regiones constantes de dos cadenas pesadas unidas mediante enlace disulfuro. Cada brazo de la Y incluye la región variable y la

primera región constante de una sola cadena pesada unida a las regiones variable y constante de una sola cadena ligera. Las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas son responsables de la unión al antígeno. La región variable de ambas cadenas contiene generalmente tres bucles altamente variables denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) (las CDR de la cadena ligera (L) incluyen LCDR1, LCDR2 y LCDR3, las CDR de la cadena pesada (H) incluyen HCDR1, HCDR2 y HCDR3). Los límites de las CDR de los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígenos aquí descritos pueden definirse o identificarse según las convenciones de Kabat, Chothia o Al-Lazikani (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. et al., J); Chothia, C. y Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. et al., Nature. Dic 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. *et al.*, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Las tres CDR se interponen entre tramos de flanco conocidos como regiones de entramado (FR), que están más conservadas que las CDR y forman un andamiaje para sostener los bucles hipervariables. Las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera no participan en la unión a antígenos, pero presentan diversas funciones efectoras. Los anticuerpos se asignan a clases basadas en la secuencia de aminoácidos de la región constante de su cadena pesada. Las cinco clases o isotipos principales de anticuerpos son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que se caracterizan por la presencia de cadenas pesadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Varias de las principales clases de anticuerpos se dividen en subclases, como IgG1 (cadena pesada γ 1), IgG2 (cadena pesada γ 2), IgG3 (cadena pesada γ 3), IgG4 (cadena pesada γ 4), IgA1 (cadena pesada α 1) o IgA2 (cadena pesada α 2).

[0027] El término "fragmento de unión a antígeno", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fragmento de anticuerpo formado a partir de una porción de un anticuerpo que comprende una o más CDR, o cualquier otro fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno pero no comprende una estructura nativa intacta de anticuerpo. Ejemplos de fragmento de unión a antígeno incluyen, sin limitación, un diacuerpo, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento Fv estabilizado por disulfuro (dsFv), un (dsFv)₂ un dsFv biespecífico (dsFv-dsFv'), un diacuerpo estabilizado por disulfuro (diacuerpo ds), una molécula de anticuerpo de cadena simple (scFv), un dímero de scFv (diacuerpo bivalente) y un anticuerpo multiespecífico. Un fragmento de unión a antígeno es capaz de unirse al mismo antígeno al que se une el anticuerpo original. En ciertas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno puede comprender una o más CDR de un anticuerpo humano particular injertado en una región de entramado de uno o más anticuerpos humanos diferentes.

[0028] "Fab" con respecto a un anticuerpo se refiere a la porción del anticuerpo que consiste en una cadena ligera única (ambas regiones variable y constante) unida a la región variable y a la primera región constante de una cadena pesada única por un enlace disulfuro.

[0029] "Fab'" se refiere a un fragmento Fab que incluye una porción de la región bisagra.

[0030] "F(ab')₂" se refiere a un dímero de Fab'.

[0031] Con respecto a un anticuerpo, "Fc" se refiere a la porción del anticuerpo que consiste en las regiones constantes segunda y tercera de una primera cadena pesada unida a las regiones constantes segunda y tercera de una segunda cadena pesada mediante enlace disulfuro. La porción Fc del anticuerpo es responsable de varias funciones efectoras, como la ADCC y la CDC, pero no de la unión al antígeno.

[0032] "Fv" con respecto a un anticuerpo se refiere al fragmento más pequeño del anticuerpo que lleva el sitio de unión al antígeno completo. Un fragmento Fv consiste en la región variable de una única cadena ligera unida a la región variable de una única cadena pesada.

[0033] "Anticuerpo Fv de cadena simple" o "scFv" se refiere a un anticuerpo diseñado que consiste en una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada conectadas entre sí directamente o a través de una secuencia enlazadora peptídica (Huston JS et al. Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)).

[0034] "Anticuerpo Fv-Fc de cadena simple" o "scFv-Fc" se refiere a un anticuerpo de ingeniería que consiste en un scFv conectado a la región Fc de un anticuerpo.

[0035] Los "diacuerpos" incluyen pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígenos, en los que los fragmentos comprenden un dominio V_H conectado a un dominio V_L en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L o V_L-V_H) (véase, p. ej., Holliger P. et al., Proc Natl Acad Sci USA. Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161). Al utilizar un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena, creando así dos sitios de unión a antígenos. Los sitios de unión al antígeno pueden dirigirse al mismo antígeno o a antígenos diferentes (o epítopos).

[0036] En ciertas realizaciones, un "(dsFv)₂" comprende tres cadenas peptídicas: dos moléculas V_H unidas por un enlazador peptídico y unidas por puentes disulfuro a dos moléculas V_L.

[0037] En ciertas realizaciones, un "diacuerpo ds biespecífico" comprende V_{H1}-V_{L2} (unido por un enlazador peptídico) unido a V_{L1}-V_{H2} (también unido por un enlazador peptídico) a través de un puente disulfuro entre V_{H1} y V_{L1}.

[0038] En ciertas realizaciones, un "dsFv biespecífico" o dsFv-dsFv" comprende tres cadenas peptídicas: una fracción V_{H1}-V_{H2} en la que las cadenas pesadas están unidas por un enlazador peptídico (p. ej., un enlazador flexible largo) y

unidas a fracciones V_{L1} y V_{L2} , respectivamente, a través de puentes disulfuro, en los que cada cadena pesada y ligera emparejada por disulfuro tiene una especificidad antigénica diferente.

[0039] En ciertas realizaciones, un "dímero scFv" es un diacuerpo bivalente o ScFv bivalente (BsFv) que comprende V_H - V_L (unidos por un enlazador peptídico) dimerizado con otra fracción V_H - V_L de tal manera que las V_H de una fracción se coordinan con las V_L de la otra fracción y forman dos sitios de unión que pueden dirigirse a los mismos antígenos (o epítopos) o a antígenos (o epítopos) diferentes. En otras realizaciones, un "dímero scFv" es un diacuerpo biespecífico que comprende V_{H1} - V_{L2} (unidos por un enlazador peptídico) asociados con V_{L1} - V_{H2} (también unidos por un enlazador peptídico) de tal manera que V_{H1} y V_{L1} se coordinan y V_{H2} y V_{L2} se coordinan y cada par coordinado tiene una especificidad de antígeno diferente.

[0040] El término "totalmente humano", tal como se utiliza en el presente documento, con referencia al anticuerpo o al fragmento de unión a antígeno, significa que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno tiene o consta de secuencia(s) de aminoácidos correspondiente(s) a la de un anticuerpo producido por un humano o una célula inmunitaria humana, o derivado de una fuente no humana tal como un animal no humano transgénico que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. En ciertas realizaciones, un anticuerpo totalmente humano no comprende residuos de aminoácidos (en particular residuos de unión a antígeno) derivados de un anticuerpo no humano.

[0041] El término "humanizado", tal como se utiliza en el presente documento, con referencia al anticuerpo o al fragmento de unión a antígeno, significa que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno comprende CDR derivadas de animales no humanos, regiones FR derivadas de humanos y, cuando proceda, las regiones constantes derivadas de humanos. Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno es útil como terapéutica humana en ciertas realizaciones porque tiene inmunogenicidad reducida en humanos. En algunas realizaciones, el animal no humano es un mamífero, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, una cabra, una oveja, una cobaya o un hámster. En algunas realizaciones, el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno se compone de secuencias sustancialmente humanas, excepto las secuencias CDR que no son humanas. En algunas realizaciones, las regiones FR derivadas de humano pueden comprender la misma secuencia de aminoácidos que el anticuerpo humano del que se deriva, o pueden comprender algunos cambios de aminoácidos, por ejemplo, no más de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 cambios de aminoácidos. En algunas realizaciones, dicho cambio en el aminoácido podría estar presente sólo en las regiones FR de cadena pesada, sólo en las regiones FR de cadena ligera o en ambas cadenas. En algunas realizaciones preferibles, los anticuerpos humanizados comprenden FR1-3 humana y JH y Jk humanas.

[0042] El término "quimérico", tal como se utiliza aquí, significa un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, que tiene una porción de cadena pesada y/o ligera derivada de una especie, y el resto de la cadena pesada y/o ligera derivada de una especie diferente. En un ejemplo ilustrativo, un anticuerpo quimérico puede comprender una región constante derivada del ser humano y una región variable de una especie no humana, como el ratón.

[0043] "PD-1" como se usa aquí se refiere a la proteína de muerte celular programada, que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina y funciona como receptor coinhibitorio para regular negativamente el sistema inmune. PD-1 es un miembro de la familia CD28/CTLA-4, y tiene dos ligandos conocidos, PD-L1 y PD-L2. La secuencia de aminoácidos representativa de la PD-1 humana se divulga bajo el número de acceso NCBI: NP_005009.2, y la secuencia representativa de ácido nucleico que codifica la PD-1 humana se muestra bajo el número de acceso NCBI: NM_005018.2.

[0044] "PD-L1", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1, véase, por ejemplo, Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027). La secuencia de aminoácidos representativa del PD-L1 humano se divulga bajo el número de acceso NCBI: NP_005009.2, y la secuencia representativa de ácido nucleico que codifica el PD-L1 humano se muestra bajo el número de acceso NCBI: NM_014143.3. PD-L1 se expresa en la placenta, el bazo, los ganglios linfáticos, el timo, el corazón, el hígado fetal y también se encuentra en muchas células tumorales o cancerosas. PD-L1 se une a su receptor PD-1 o B7-1, que se expresa en las células T activadas, las células B y las células mieloides. La unión de PD-L1 y su receptor induce la transducción de señales para suprimir la activación mediada por el TCR de la producción de citocinas y la proliferación de células T. En consecuencia, el PD-L1 desempeña un papel importante en la supresión del sistema inmunitario durante acontecimientos particulares como el embarazo, las enfermedades autoinmunes, los aloinjertos de tejidos, y se cree que permite a las células tumorales o cancerosas eludir el punto de control inmunológico y evadir la respuesta inmunitaria.

[0045] "Anticuerpo anti-PD-1" como se usa aquí se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a PD-1 (p. ej., PD-1 humana o de mono) con una afinidad que es suficiente para proporcionar un uso diagnóstico y/o terapéutico.

[0046] El término "unión específica" o "se une específicamente", tal como se utiliza aquí, se refiere a una reacción de unión no aleatoria entre dos moléculas, como por ejemplo entre un anticuerpo y un antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno proporcionados en el presente documento se unen específicamente a PD-1 humana y/o de mono con una afinidad de unión (K_D) de $\leq 10^{-6}$ M (p. ej., $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, 10^{-10} M). K_D , tal como se utiliza aquí, se refiere a la relación entre la velocidad de disociación y la velocidad de asociación (k_{off}/k_{on}), puede determinarse utilizando métodos de resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, utilizando un instrumento como Biacore.

[0047] La capacidad de "bloquear la unión" o "competir por el mismo epítipo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de inhibir la interacción de unión entre dos moléculas (p. ej., PD-1 humana y un anticuerpo anti-PD-1) en cualquier grado detectable. En ciertas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que bloquea la unión entre dos moléculas inhibe la interacción de unión entre las dos moléculas al menos en un 50%. En ciertas realizaciones, esta inhibición puede ser superior al 60%, superior al 70%, superior al 80% o superior al 90%.

[0048] El término "epítipo", tal como se utiliza aquí, se refiere al grupo específico de átomos o aminoácidos de un antígeno al que se une un anticuerpo. Dos anticuerpos pueden unirse al mismo epítipo dentro de un antígeno si muestran una unión competitiva por el antígeno. Por ejemplo, si un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según se divulga en el presente documento bloquea la unión de los anticuerpos ejemplares tales como hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.103.11-v2, hAb 1.139.15, y hAb 1.153.7 a PD-1 humana, entonces puede considerarse que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une al mismo epítipo que esos anticuerpos ejemplares.

[0049] Se puede mutar un residuo de aminoácido concreto dentro del epítipo, p. ej., mediante mutagénesis de barrido de alanina, y se identifican las mutaciones que reducen o impiden la unión a la proteína. La "mutagénesis de barrido de alanina" es un método que puede realizarse para identificar determinados residuos o regiones de una proteína que afectan a la interacción del epítipo con otro compuesto o proteína que se une a él. Un residuo o grupo de residuos objetivo dentro de la proteína se sustituye por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina, o una sustitución conservadora de aminoácidos). Cualquier mutación de los residuos de aminoácidos o codones que codifican los mismos que reduzca la unión de la proteína más de un umbral o reduzca la unión de la proteína al grado máximo que otras mutaciones es probable que se encuentre dentro del epítipo unido por la proteína. En ciertas realizaciones de la presente divulgación, el epítipo que es crítico para el anticuerpo de PD-1 comprende al menos uno de los residuos aminoácidos de V64, P83, D85, L128, A129, P130, K131, A132 y Q133.

[0050] "hAb 1.7.3", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal totalmente humano que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 45, región variable de cadena ligera de SEQ ID N.º: 47, y una región constante humana de isotipo IgG4.

[0051] "hAb 1.49.9", tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo monoclonal totalmente humano que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 49, región variable de cadena ligera de SEQ ID N.º: 51, y una región constante humana de isotipo IgG4.

[0052] "hAb 1.103.11", tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo monoclonal totalmente humano que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 53, región variable de cadena ligera de SEQ ID N.º: 55, y una región constante humana de isotipo IgG4.

[0053] "hAb 1.103.11-v2", tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo monoclonal totalmente humano que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 53, región variable de cadena ligera de SEQ ID N.º: 67, y una región constante humana de isotipo IgG4.

[0054] "hAb 1.139.15", tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo monoclonal totalmente humano que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 57, región variable de cadena ligera de SEQ ID N.º: 59, y una región constante humana de isotipo IgG4.

[0055] "hAb 1.153.7", tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo monoclonal totalmente humano que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 61, región variable de cadena ligera de SEQ ID N.º: 63, y una región constante humana de isotipo IgG4.

[0056] Una "sustitución conservadora" con referencia a la secuencia de aminoácidos se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente que tenga una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones conservadoras entre residuos de aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas (p. ej., Met, Ala, Val, Leu e Ile), entre residuos con cadenas laterales hidrófilas neutras (p. ej., Cys, Ser, Thr, Asn y Gln), entre residuos con cadenas laterales ácidas (p. ej., Asp, Glu), entre aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., His, Lys y Arg), o entre residuos con cadenas laterales aromáticas (p. ej., Trp, Tyr y Phe). Como se sabe en la técnica, la sustitución conservadora no suele causar cambios significativos en la estructura conformacional de la proteína y, por lo tanto, podría conservar la actividad biológica de una proteína.

[0057] "Porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a la secuencia de aminoácidos (o secuencia de ácidos nucleicos) se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos (o ácidos nucleicos) en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos (o ácidos nucleicos) en una secuencia de referencia, después de alinear las secuencias y, si es necesario, introducir huecos, para alcanzar el número máximo de aminoácidos (o ácidos nucleicos) idénticos. La sustitución conservadora de los residuos de aminoácidos puede o no considerarse como residuos idénticos. La alineación para determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos (o ácidos nucleicos) puede lograrse, por ejemplo, utilizando herramientas de acceso público como BLASTN, BLASTp (disponible en el sitio web del

Centro Nacional de Información Biotecnológica de EE.UU. (NCBI), véase también, Altschul S.F. et al, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res, 25:3389-3402 (1997)), ClustalW2 (disponible en el sitio web del Instituto Europeo de Bioinformática, véase también, Higgins D.G. et al, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, Bioinformatics (Oxford, Inglaterra), 23(21): 2947-8 (2007)), y el software ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden utilizar los parámetros por defecto proporcionados por la herramienta, o pueden personalizar los parámetros según convenga para la alineación, como por ejemplo, seleccionando un algoritmo adecuado.

[0058] "Célula T" como se usa aquí incluye células T CD4⁺, células T CD8⁺, células T auxiliares tipo 1, células T auxiliares tipo 2, células T auxiliares tipo 17 y células T inhibidoras.

[0059] Las "funciones efectoras", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la unión de la región Fc de un anticuerpo a sus efectores, como el complejo C1 y el receptor Fc. Las funciones efectoras ejemplares incluyen: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) inducida por la interacción de anticuerpos y C1q en el complejo C1; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) inducida por la unión de la región Fc de un anticuerpo al receptor Fc en una célula efectora; y fagocitosis.

[0060] "Cáncer" o "condición cancerosa" como se usa aquí se refiere a cualquier condición médica mediada por crecimiento celular neoplásico o maligno, proliferación o metástasis, e incluye tanto cánceres sólidos como no sólidos como la leucemia. "Tumor" se entiende como una masa sólida de células neoplásicas y/o malignas.

[0061] "Tratar" o "tratamiento" de una afección, tal como se utiliza en el presente documento, incluye prevenir o aliviar una afección, ralentizar el inicio o la tasa de desarrollo de una afección, reducir el riesgo de desarrollar una afección, prevenir o retrasar el desarrollo de síntomas asociados con una afección, reducir o poner fin a los síntomas asociados con una afección, generar una regresión completa o parcial de una afección, curar una afección, o alguna combinación de los mismos. Con respecto al cáncer, "tratar" o "tratamiento" puede referirse a inhibir o ralentizar el crecimiento, la proliferación o la metástasis de células neoplásicas o malignas, prevenir o retrasar el desarrollo del crecimiento, la proliferación o la metástasis de células neoplásicas o malignas, o alguna combinación de los mismos. Con respecto a un tumor, "tratar" o "tratamiento" incluye erradicar todo o parte de un tumor, inhibir o ralentizar el crecimiento tumoral y la metástasis, prevenir o retrasar el desarrollo de un tumor, o alguna combinación de los mismos.

[0062] Una sustancia "aislada" ha sido alterada por la mano del hombre a partir de su estado natural. Si una composición o sustancia "aislada" aparece en la naturaleza, ha sido modificada o retirada de su entorno original, o ambas cosas. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en un animal vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido está "aislado" si se ha separado lo suficiente de los materiales coexistentes de su estado natural como para existir en un estado sustancialmente puro. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno tienen una pureza de al menos 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% determinada por métodos electroforéticos (como SDS-PAGE, enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar), o métodos cromatográficos (como cromatografía de intercambio iónico o HPLC de fase inversa).

[0063] El término "vector", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un vehículo en el que se puede insertar de forma operativa un polinucleótido que codifica una proteína para provocar la expresión de dicha proteína. Un vector puede utilizarse para transformar, transducir o transfectar una célula huésped con el fin de provocar la expresión del elemento genético que porta dentro de la célula huésped. Algunos ejemplos de vectores son los plásmidos, fagémidos, cósmidos, cromosomas artificiales como el cromosoma artificial de levadura (YAC), el cromosoma artificial bacteriano (BAC) o el cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), bacteriófagos como el fago lambda o el fago M13, y virus animales. Las categorías de virus animales utilizados como vectores incluyen retrovirus (incluyendo lentivirus), adenovirus, virus adeno-asociados, herpesvirus (p. ej., virus del herpes simple), poxvirus, baculovirus, papilomavirus y papovavirus (por ejemplo, SV40). Un vector puede contener diversos elementos para controlar la expresión, como secuencias promotoras, secuencias de iniciación de la transcripción, secuencias potenciadoras, elementos seleccionables y genes informadores. Además, el vector puede contener un origen de replicación. Un vector también puede incluir materiales que ayuden a su entrada en la célula, incluidos, entre otros, una partícula vírica, un liposoma o un recubrimiento proteico.

[0064] La frase "célula huésped", tal como se utiliza aquí, se refiere a una célula en la que se ha introducido un polinucleótido exógeno y/o un vector.

[0065] Una "enfermedad asociada con o relacionada con PD-1" como se usa aquí se refiere a cualquier condición que es causada por, exacerbada por, o de otra manera vinculada a la expresión o actividades aumentadas o disminuidas de PD-1 (p. ej., una PD-1 humana).

[0066] El término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la dosis o concentración de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o afección asociada a la PD-1 humana. Por ejemplo, con respecto al uso de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aquí divulgados para tratar el cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz es la dosis o concentración del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno capaz de erradicar total o parcialmente un tumor, inhibir o ralentizar el crecimiento tumoral, inhibir el crecimiento o la proliferación de células mediadoras de una afección cancerosa, inhibir la metástasis de células tumorales, mejorar cualquier síntoma o marcador asociado con un tumor o afección cancerosa, prevenir o retrasar el desarrollo de un tumor

o afección cancerosa, o alguna combinación de los mismos.

[0067] El término "farmacéuticamente aceptable" indica que el portador, vehículo, diluyente, excipiente(s) y/o sal designados son generalmente compatibles química y/o físicamente con los demás ingredientes que componen la formulación, y fisiológicamente compatibles con el receptor de la misma.

Anticuerpo anti-PD-1

[0068] En el presente documento se describen anticuerpos anti-PD-1 y sus fragmentos de unión a antígeno. La PD-1, también denominada CD279, es un receptor inmunitario clave expresado por los linfocitos T activados, que actúa como mediador de la inmunosupresión. El ligando 1 de PD-1 (PD-L1) es una proteína transmembrana de 40 kDa que se expresa en diversas células tumorales, células estromales o ambas, y se une a PD-1. La inhibición de la interacción entre PD-1 y PD-L1 puede potenciar la respuesta de las células T y, por tanto, mediar en la actividad anticancerosa.

[0069] Se divulgan aquí anticuerpos monoclonales totalmente humanos ejemplares hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.103.11-v2, hAb 1.139.15, y hAb 1.153.7, cuyas secuencias CDR se muestran en la Tabla 1 a continuación, y secuencias de región variable de cadena pesada o ligera también se muestran a continuación. Los anticuerpos hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.139.15 y hAb 1.153.7 se muestran con fines ilustrativos.

Tabla 1

	CDR1	CDR2	CDR3
1.7.3 hAb-VH(23466-VH)	SEQ ID NO: 1 STTYWV	SEQ ID NO: 3 SISYSGNTYINPSLKS	SEQ ID NO: 5 HILGYNGRYLPFDY
	SEQ ID NO: 2 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	SEQ ID NO: 4 AGT ATC TCT TAT AGT GGG AAC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	SEQ ID NO: 6 CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.7.3 hAb - VL(23195-VL)	SEQ ID NO: 7 TGTSSDVGFYNYVS	SEQ ID NO: 9 DVTNRPS	SEQ ID NO: 11 SSYTSISTWV
	SEQ ID NO: 8 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	SEQ ID NO: 10 GAT GTC ACT AAT CGG CCC TCA	SEQ ID NO: 12 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG
1.49.9 hAb - VH(20951-VH)	SEQ ID NO: 13 SSTYYWG	SEQ ID NO: 15 SISYSGNTYINPSLKS	SEQ ID NO: 5 HILGYNGRYLPFDY
	SEQ ID NO: 14 AGT AGT ACT TAC TAC TGG GGC	SEQ ID NO: 16 AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	SEQ ID NO: 6 CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.49.9 hAb - VH(20951-VL)	SEQ ID NO: 7 TGTSSDVGFYNYVS	SEQ ID NO: 17 DVTNRPS	SEQ ID NO: 11 SSYTSISTWV
	SEQ ID NO: 8 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	SEQ ID NO: 18 GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA	SEQ ID NO: 12 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG
1.103.11 hAb -	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 5

(continuación)

	CDR1	CDR2	CDR3
VH(20975-VH)	STTYVWV	SISYSGSTYYNPSLKS	HLGYNGRYLPFDY
	SEQ ID NO:2 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	SEQ ID NO:16 AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	SEQ ID NO:6 CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
	SEQ ID NO:7 TGTSSDVGfYNYVS	SEQ ID NO: 17 DVSNRPS	SEQ ID NO:19 SSYTNISTWV
1.103.11 hAb - VH(20975-VL)	SEQ ID NO: 8 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	SEQ ID NO:18 GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA	SEQ ID NO:20 AGC TCA TAT ACA AAC ATC AGC ACT TGG GTG
	SEQ ID NO:21 STTYWVG	SEQ ID NO:23 SISYSGTYYNPSLKS	SEQ ID NO:25 HLGYNSNWYFFDY
	SEQ ID NO:22 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GGC	SEQ ID NO:24 AGT ATC TCT TAT AGT GGG ACC ACC TAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT	SEQ ID NO:26 CAT CTC GGG TAT AAC AGC AAC TGG TAC CCT TTT GAC TAC
1.139.15 hAb - VH(23521-VL)	SEQ ID NO:27 TGTSSDVGfSYNRVS	SEQ ID NO:29 EVSNRPS	SEQ ID NO:31 SSYTSSSTWV
	SEQ ID NO:28 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT AGT TAT AAC CGT GTC TCC	SEQ ID NO:30 GAG GTC AGT AAT CGG CCC TCA	SEQ ID NO:32 AGC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACT TGG GTG
	SEQ ID NO:33 SHAMS	SEQ ID NO:35 TTTGGGGSYYADSVKG	SEQ ID NO:37 NRAGEGYFDY
1.153.7 hAb -VH(20942-VH)			

(continuación)

	CDR1	CDR2	CDR3
	SEQ ID NO:34 AGC CAT GCC ATG AGC	SEQ ID NO:36 ACT ATT ACT GGT GGT GGT GGT AGC ATA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC	SEQ ID NO:38 AAC CGC GCT GGG GAG GGT TAC TTT GAC TAC
1.153.7 hAb -VH(20942-VL)	SEQ ID NO:39 GGDNIGNKDVH	SEQ ID NO:41 RDSNRPS	SEQ ID NO:43 QVWDSIWW
	SEQ ID NO:40 GGG GGA GAC AAC ATT GGA AAT AAA GAT GTG CAC	SEQ ID NO:42 AGG GAT AGC AAC CCG CCC TCT	SEQ ID NO:44 CAG GTG TGG GAC AGC ATT TGG GTG
1.103.11-v2 hAb - VH(20975-VH)	SEQ ID NO:1 STTYWW	SEQ ID NO:15 SISVSGSTYNPSLKS	SEQ ID NO:5 HLGYNQRYLPFDY
	SEQ ID NO:2 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC	SEQ ID NO:16 AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT	SEQ ID NO:6 CAT CTA GGG TAT AAT GGG AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC
1.103.11-v2 hAb - VH(20975-2-VL)	SEQ ID NO:7 TGTSSDVGFYNYVS	SEQ ID NO:17 DVSNRPS	SEQ ID NO:65 SSYTSISTWV
	SEQ ID NO:8 ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT TTT TAT AAC TAT GTC TCC	SEQ ID NO:18 GAT GTC AGT AAT CCG CCC TCA	SEQ ID NO:66 AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG

[0070] hAb 1.7.3 -VH(23466-VH): (SEQ ID N.º:45 para aminoácidos y SEQ ID N.º:46 para ácidos nucleicos) con CDR de cadena pesada 1-3: SEQ ID N.º: 1, 3, 5 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:2, 4, 6 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

segmento V: IGHV4-39*01

segmento D: IGHD1-26*01

segmento J: IGHJ4*02

	Q	L	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S
1	CAG	CTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG

ES 2 992 478 T3

E T L T L T C T V S G D S I S
46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GAC TCC ATC AGC

5

CDR1

~~~~~

10

S T T Y Y W V W I R Q P P G K  
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

~~~~~

15

G L E W I G S I S Y S G N T Y
136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AAC ACC TAC

20

CDR2

~~~~~

25

Y N P S L K S R V T I S V D T  
181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG

30

S K N H F S L K L S S V A A T  
226 TCC AAG AAC CAC TTC TCC CTG AAG CTG AGT TCT GTG GCC GCC ACA

35

CDR3

~~~~~

40

D T A L Y Y C A R H L G Y N G
271 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

45

CDR3

~~~~~

50

R Y L P F D Y W G Q G T L V T  
316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

55

V S S (SEQ ID NO: 45)  
361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 46)

60

**[0071] hAb 1.7.3 -VL(23195-VL):** (SEQ ID N.º:47 para aminoácidos y SEQ ID N.º:48 para ácidos nucleicos) con CDR 1-3 de cadena ligera: SEQ ID N.º: 7, 9, 11 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:8, 10, 12 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

segmento V: IGLV2-14\*01  
segmento J: IGLJ3\*02

65

Q S A L T Q P A S V S G S P G

# ES 2 992 478 T3

1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

5 CDR1

~~~~~

10 46 Q S I T I S C T G T S S D V G
CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

~~~~~

15 91 F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A  
TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

~~~~~

20 25 P E L M I Y D V T N R P S G V
136 CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC ACT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

30 181 S D R F S G S K S G N T A S L
TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

35 40 T I S G L Q A E D E A D Y Y C
226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

~~~~~

45 261 S S Y T S I S T W V F G G G T  
AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

50 K L T V L (SEQ ID NO: 47)  
316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 48)

**[0072] hAb 1.49.9 -VH(20951-VH):** (SEQ ID N.º:49 para aminoácidos y SEQ ID N.º:50 para ácidos nucleicos) con CDR 1-3 de cadena pesada: SEQ ID N.º: 13, 15, 5 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:14, 16, 6 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

segmento V: IGHV4-39\*01  
segmento D: IGHD1-26\*01  
segmento J: IGHJ4\*02

60 65 Q L Q L Q E S G P G L V K P S  
1 CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

5  
46 E T L S L T C T V S G G S I S  
GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC

## CDR1

~~~~~

10
91 S S T Y Y W G W I R Q P P G K
AGT AGT ACT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

~~~~~

20  
136 G L E W I G S I S Y S G S T Y  
GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

## CDR2

~~~~~

25
181 Y N P S L K S R V T I S V D T
TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCC GTA GAC ACG

35
226 S K N Q F S L K L S S V T D A
TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GAC GCA

CDR3

~~~~~

40  
261 D T A V Y Y C A R H L G Y N G  
GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

## CDR3

~~~~~

50
316 R Y L P F D Y W G Q G T L V T
AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

55
361 V S S (SEQ ID NO: 49)
GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 50)

60 **[0073] hAb 1.49.9 -VL(21526-VL):** (SEQ ID N.º:51 para aminoácidos y SEQ ID N.º:52 para ácidos nucleicos) con CDR 1-3 de cadena ligera: SEQ ID N.º: 7, 17, 11 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:8, 18, 12 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

segmento V: IGLV2-14*01

segmento J: IGLJ3*02

ES 2 992 478 T3

1 Q S A L T Q P A S V S G S P G
CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

5

CDR1

~~~~~

10

46 Q S I T I S C T G T S S D V G  
CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

~~~~~

15

91 F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A
TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

20

CDR2

~~~~~

25

136 P E V M I Y D V S N R P S G V  
CCC GAA GTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

30

181 S D R F S G S K S G N T A S L  
TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

35

226 T I S G L Q A E D E A D Y Y C  
ACT ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

40

CDR3

~~~~~

45

261 S S Y T S I S T W V F G G G T
AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

50

K L T V L (SEQ ID NO: 51)
316 AAG CTG ACT GTC CTA (SEQ ID NO: 52)

55

[0074] hAb 1.103.11 -VH(20975-VH): (SEQ ID N.º:53 para aminoácidos y SEQ ID N.º:54 para ácidos nucleicos) con CDR 1-3 de cadena pesada: SEQ ID N.º: 1, 15, 5 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:2, 16, 6 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

60

segmento V: IGHV4-39*01
segmento D: IGHD1-26*01
segmento J: IGHJ4*02

65

ES 2 992 478 T3

1 Q L Q L Q E S G P G L V K P S
CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

5 E T L T L T C T V S A D S I S
46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GCT GAC TCC ATC AGC

CDR1

15 S T T Y Y W V W I R Q P P G K
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

20 G L E W I G S I S Y S G S T Y
136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

CDR2

25 Y N P S L K S R V T V S V D T
181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC GTA TCC GTA GAC ACG

35 S K N Q F S L K L N S V A A T
226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG GCC GCC ACA

CDR3

40 D T A L Y Y C A R H L G Y N G
45 261 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

50 R Y L P F D Y W G Q G T L V T
55 316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

60 V S S (SEQ ID NO: 53)
361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 54)

[0075] hAb 1.103.11 -VL(21038-VL): (SEQ ID N.º:55 para aminoácidos y SEQ ID N.º:56 para ácidos nucleicos) con CDR 1-3 de cadena ligera: SEQ ID N.º: 7, 17, 19 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:8, 18, 20 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

segmento V: IGLV2-14*01

ES 2 992 478 T3

segmento J: IGLJ3 * 02

Q S A L T Q P A S V S G S P G
1 CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

CDR1

Q S I T I S C T G T S S D V G
46 CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

CDR1

F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A
91 TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

CDR2

P E L M I Y D V S N R P S G V
136 CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

S D R F S G S K S G N T A S L
181 TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

T I S G L Q A E D E A D Y Y C
226 ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

CDR3

S S Y T N I S T W V F G G G T
261 AGC TCA TAT ACA AAC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

K L T V L (SEQ ID NO: 55)
316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 56)

[0076] hAb 1.139.15 -VH(23521-VH) (SEQ ID N.º:57 para aminoácido y SEQ ID N.º:58 para ácido nucleico) con CDR 1-3 de cadena pesada: SEQ ID N.º: 21, 23, 25 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:22, 24, 26 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

segmento V: IGHV4-39*01

segmento D: IGHD6-13*01

segmento J: IGHJ4*02

ES 2 992 478 T3

1 Q L Q L Q E S G P G L V K P S
CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCC TCG

5

46 E T L S L T C T V S G G S I S
GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGC

10

CDR1

~~~~~

91 S T T Y Y W G W I R Q P P G K  
AGT ACT ACT TAC TAC TGG GGC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

15

CDR2

~~~~~

136 G L E W I G S I S Y S G T T Y
GGG CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG ACC ACC TAC

25

CDR2

~~~~~

181 Y N P S L K S R V T I P V D T  
TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATC CCC GTA GAC ACG

30

35

226 S K N Q I S L K L S S V T A A  
TCC AAG AAC CAG ATC TCC CTG AAA CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCA

40

CDR3

~~~~~

261 D T S L Y Y C A R H L G Y N S
GAC ACG TCT TTG TAT TAT TGT GCG AGA CAT CTC GGG TAT AAC AGC

45

50

CDR3

~~~~~

316 N W Y P F D Y W G Q G T L V T  
AAC TGG TAC CCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

55

60

361 V S S (SEQ ID NO: 57)  
GTC TCC TCA (SEQ ID NO: 58)

65

[0077] hAb 1.139.15 -VL(22895-VL) (SEQ ID N.º:59 para aminoácido y SEQ ID N.º:60 para ácido nucleico) con CDR 1-3 de cadena ligera: SEQ ID N.º: 27, 29, 31 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º: 28, 30, 32 son secuencias de ácido nucleico, respectivamente:

# ES 2 992 478 T3

segmento V: IGLV2-18\*02  
segmento J: IGLJ3\*02

5  
1 Q S A L T Q P P S V S G S P G  
CAG TCG GCC CTG ACT CAG CCT CCC TCC GTG TCC GGG TCT CCT GGA

10  
CDR1  
~~~~~

15
46 Q S V T I S C T G T S S D V G
CAG TCA GTC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

20
CDR1
~~~~~

25  
91 S Y N R V S W Y Q Q P P G T A  
AGT TAT AAC CGT GTC TCC TGG TAC CAG CAG CCC CCA GGC ACA GCC

30  
CDR2  
~~~~~

35
136 P E V I I Y E V S N R P S G V
CCC GAA GTC ATT ATT TAT GAG GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTC

40
181 P D R F S G S K S G N T A S L
CCT GAT CGC TTC TCT GGG TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

45
CDR3
~~~~~

50  
226 T I S G L Q A E D E A D Y Y C  
ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

55  
CDR3  
~~~~~

60
261 S S Y T S S S T W V F G G G T
AGC TCA TAT ACA AGC AGC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

65
K L T V L (SEQ ID NO: 59)
316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 60)

[0078] hAb 1.153.7 -VH(20942-VH): (SEQ ID N.º:61 para aminoácidos y SEQ ID N.º:62 para ácidos nucleicos) con CDR 1-3 de cadena pesada: SEQ ID N.º: 33, 35, 37 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º: 34, 36, 38 son secuencias de ácido nucleico, respectivamente:

segmento V: IGHV3-23*01
segmento D: IGHD7-27*01
segmento J: IGHJ4*02

ES 2 992 478 T3

1 E V Q L L E S G G G L V Q P G
GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG

5

46 G S L R L S C A A S G F T F S
GGG TCC CTG AGA CTG TCC TGC GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC

10

CDR1

~~~~~

15

91 S H A M S W V R Q A P G K G L  
AGC CAT GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG

20

CDR2

~~~~~

25

136 E W V S T I T G G G S I Y Y
GAG TGG GTC TCA ACT ATT ACT GGT GGT GGT GGT AGC ATA TAC TAC

CDR2

~~~~~

30

181 A D S V K G R F T I S R D N S  
GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC

35

226 K N T L Y L Q M N S L R A E D  
AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

40

CDR3

~~~~~

45

261 T A V Y Y C A K N R A G E G Y
ACG GCC GTA TAT TAT TGT GCG AAA AAC CGC GCT GGG GAG GGT TAC

50

CDR3

~~~~~

55

61) F D Y W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:  
316 TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA (SEQ ID NO:  
62)

60

**[0079] hAb 1.153.7 -VL(21110-VL)** (SEQ ID N.º:63 para aminoácido y SEQ ID N.º:64 para ácido nucleico) con CDR 1-3 de cadena ligera: SEQ ID N.º: 39, 41, 43 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º: 40, 42, 44 son secuencias de ácido nucleico, respectivamente:

segmento V: IGLV3-9\*01

segmento J: IGLJ3\*02

65

# ES 2 992 478 T3

1 S Y E L T Q P L S V S V A L G  
TCC TAT GAG CTG ACT CAG CCA CTC TCA GTG TCA GTG GCC CTG GGA

5 CDR1  
~~~~~

10 46 Q T A R I T C G G D N I G N K
CAG ACG GCC AGG ATT ACC TGT GGG GGA GAC AAC ATT GGA AAT AAA

15 CDR1
~~~~~

20 91 D V H W Y Q Q K P G Q A P V L  
GAT GTG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC CAG GCC CCT GTG CTG

CDR2

~~~~~

25 136 V I Y R D S N R P S G I P E G
GTC ATC TAT AGG GAT AGC AAC CGG CCC TCT GGG ATC CCT GAG GGA

30 181 F S G S N S G N T A T L T I S
TTC TCT GGC TCC AAC TCG GGG AAC ACG GCC ACC CTG ACC ATC AGC

CDR3

~~~~~

40 226 R A Q A G D E A D Y Y C Q V W  
AGA GCC CAA GCC GGG GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG

CDR3

~~~~~

50 261 D S I W V F G G G T K L T V L (SEQ ID NO: 63)
GAC AGC ATT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 64)

[0080] hAb 1.103.11-v2 -VH(20975-VH): (SEQ ID N.º:53 para aminoácidos y SEQ ID N.º:54 para ácidos nucleicos) con CDR 1-3 de cadena pesada: SEQ ID N.º: 1, 15, 5 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:2, 16, 6 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

segmento V: IGHV4-39*01
segmento D: IGHD1-26*01
segmento J: IGHJ4*02

ES 2 992 478 T3

1 Q L Q L Q E S G P G L V K P S
CAG CTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG

5 E T L T L T C T V S A D S I S
46 GAG ACC CTG ACC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GCT GAC TCC ATC AGC

CDR1

15 S T T Y Y W V W I R Q P P G K
91 AGT ACT ACT TAC TAC TGG GTC TGG ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG

CDR2

20 G L E W I G S I S Y S G S T Y
136 GGA CTG GAG TGG ATT GGG AGT ATC TCT TAT AGT GGG AGC ACC TAC

CDR2

25 Y N P S L K S R V T V S V D T
181 TAC AAT CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC GTA TCC GTA GAC ACG

35 S K N Q F S L K L N S V A A T
226 TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AAC TCT GTG GCC GCC ACA

CDR3

40 D T A L Y Y C A R H L G Y N G
261 GAC ACG GCT CTA TAT TAC TGT GCG AGA CAT CTA GGG TAT AAT GGG

CDR3

50 R Y L P F D Y W G Q G T L V T
316 AGG TAC CTC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC

V S S (SEQ ID NO: 53)
361 GTC TCC TCC (SEQ ID NO: 54)

[0081] hAb 1.103.11-v2 -VL(21038-2-VL): (SEQ ID N.º:67 para aminoácidos y SEQ ID N.º:68 para ácidos nucleicos) con CDR 1-3 de cadena ligera: SEQ ID N.º: 7, 17, 65 son secuencias de aminoácidos y SEQ ID N.º:8, 18, 66 son secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente:

segmento V: IGLV2-14*01

segmento J: IGLJ3*02

5
1 Q S A L T Q P A S V S G S P G
CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT GCC TCC GTG TCT GGG TCT CCT GGA

10
CDR1
~~~~~

15  
46 Q S I T I S C T G T S S D V G  
CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC AGC AGT GAC GTT GGT

20  
CDR1  
~~~~~

25
91 F Y N Y V S W Y Q Q H P G K A
TTT TAT AAC TAT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC AAA GCC

30
CDR2
~~~~~

35  
136 P E L M I Y D V S N R P S G V  
CCC GAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT AAT CGG CCC TCA GGG GTT

40  
181 S D R F S G S K S G N T A S L  
TCT GAT CGC TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG

45  
226 T I S G L Q A E D E A D Y Y C  
ACC ATC TCT GGG CTC CAG GCT GAG GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC

50  
CDR3  
~~~~~

55
261 S S Y T S I S T W V F G G G T
AGC TCA TAT ACA AGC ATC AGC ACT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC

60
K L T V L (SEQ ID NO: 67)
316 AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 68)

60 [0082] Los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento pueden comprender secuencias CDR de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID N.º: 1, 3, 5, 13, 15, 21, 23, 25, 33, 35, y 37. Los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento pueden comprender secuencias CDR de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID N.º: 7, 9, 11, 17, 19, 27, 29, 31, 39, 41, 43 y 65. Una o más secuencias de CDR proporcionadas en el presente documento pueden modificarse o cambiarse de modo que el anticuerpo resultante mejore con respecto al anticuerpo original en una o más propiedades (como una mejor unión al antígeno, un mejor patrón de glicosilación, un menor riesgo de glicosilación en un residuo de CDR, una menor desaminación en un residuo de CDR, una mayor semivida

65

farmacocinética, sensibilidad al pH y compatibilidad con la conjugación) y, por lo demás, sea comparable al anticuerpo original (es decir, un anticuerpo que tenga por lo demás el mismo conjunto de secuencias de CDR excepto por la modificación o el cambio mencionados anteriormente), o que al menos conserve sustancialmente la propiedad de unión a antígeno del anticuerpo original.

[0083] Los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento pueden comprender una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 3, y/o SEQ ID N.º: 5; una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 13, SEQ ID N.º: 15, y/o SEQ ID N.º: 5; una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 15, y/o SEQ ID N.º: 5; una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 21, SEQ ID N.º: 23, y/o SEQ ID N.º: 25; y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 33; SEQ ID N.º: 35, y/o SEQ ID N.º: 37.

[0084] Los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento pueden comprender una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 9, y/o SEQ ID N.º: 11; una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 17, y/o SEQ ID N.º: 11; una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 17, y/o SEQ ID N.º: 19; una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 27; SEQ ID N.º: 29, y/o SEQ ID N.º: 31; una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 39, SEQ ID N.º: 41, y/o SEQ ID N.º: 43; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 17, y/o SEQ ID N.º: 65.

[0085] Los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos aquí divulgados pueden comprender: a) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 3, y/o SEQ ID N.º: 5; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 9, y/o SEQ ID N.º: 11; b) una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 13, SEQ ID N.º: 15, y/o SEQ ID N.º: 5; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 17, y/o SEQ ID N.º: 11; c) una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 15, y/o SEQ ID N.º: 5; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 17, y/o SEQ ID N.º: 19; d) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 21, SEQ ID N.º: 23, y/o SEQ ID N.º: 25 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 27; SEQ ID N.º: 29, y/o SEQ ID N.º: 31; e) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 33; SEQ ID N.º: 35, y/o SEQ ID N.º: 37; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 39, SEQ ID N.º: 41, y/o SEQ ID N.º: 43; o f) una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 15, y/o SEQ ID N.º: 5; y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 17, y/o SEQ ID N.º: 65.

[0086] Un experto entenderá que las secuencias CDR proporcionadas en la Tabla 1 pueden modificarse para contener una o más sustituciones de aminoácidos, con el fin de proporcionar una actividad biológica mejorada tal como una afinidad de unión mejorada a PD-1 humana. Por ejemplo, se puede generar y expresar una biblioteca de variantes de anticuerpos (como variantes Fab o scFv) con tecnología de expresión en fagos y, a continuación, analizar la afinidad de unión a PD-1 humana. Por ejemplo, se puede utilizar un programa informático para simular virtualmente la unión de los anticuerpos a la PD-1 humana e identificar los residuos de aminoácidos de los anticuerpos que forman la interfaz de unión. Dichos residuos pueden evitarse en la sustitución para prevenir la reducción de la afinidad de unión, o pueden ser objeto de sustitución para proporcionar una unión más fuerte. Al menos una (o todas) de las sustituciones en las secuencias CDR puede ser una sustitución conservadora.

[0087] Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en el presente documento pueden comprender una o más secuencias CDR que tengan al menos un 80% (p. ej., al menos 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) identidad de secuencia con la (o las) enumeradas en la Tabla 1, y mientras tanto retener la afinidad de unión a PD-1 humana a un nivel similar o incluso superior al de su anticuerpo parental que tiene sustancialmente la misma secuencia excepto que la secuencia CDR correspondiente tiene una identidad de secuencia del 100% con la (o las) enumeradas en la Tabla 1.

[0088] En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos son totalmente humanos. Los anticuerpos totalmente humanos no presentan los problemas de inmunogenicidad en humanos y/o afinidad de unión reducida que suelen observarse con los anticuerpos humanizados.

[0089] Los anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden una región variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 53; y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo formado por: SEQ ID N.º: 55, y SEQ ID N.º: 67.

[0090] También se divulgan en el presente documento los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno que compiten por el mismo epítipo con los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento. Los anticuerpos pueden bloquear la unión de hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.103.11-v2, hAb 1.139.15, o hAb 1.153.7 a PD-1 humana o de mono, por ejemplo, a un valor IC_{50} (es decir, concentración de inhibición del 50%) inferior a 10^{-6} M, inferior a 10^{-7} M, inferior a $10^{-7.5}$ M, inferior a 10^{-8} M, inferior a $10^{-8.5}$ M, inferior a 10^{-9} M, o inferior a 10^{-10} M. Los valores IC_{50} se determinan sobre la base de un ensayo de competencia, como los ensayos

ELISA, los ensayos de unión por competencia de radioligandos y el análisis FACS.

[0091] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento son capaces de unirse específicamente a PD-1 humana con una afinidad de unión (K_d) de $\leq 10^{-6}$ M (p.ej., $\leq 5 \times 10^{-7}$ M, $\leq 2 \times 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 5 \times 10^{-8}$ M, $\leq 2 \times 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, $\leq 10^{-9}$ M, 10^{-10} M) según se mide mediante ensayo de unión por resonancia de plasmón. La afinidad de unión puede representarse mediante el valor K_D , que se calcula como la relación entre la velocidad de disociación y la velocidad de asociación (K_{off}/K_{on}) cuando la unión entre el antígeno y la molécula de unión al antígeno alcanza el equilibrio. La afinidad de unión al antígeno (p. ej., K_D) puede determinarse apropiadamente utilizando métodos adecuados conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el ensayo de unión por resonancia de plasmón utilizando instrumentos como Biacore (véase, por ejemplo, Murphy, M. et al, Current protocols in protein science.).

[0092] En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que son capaces de unirse específicamente a PD-1 humana a un valor K_d no superior a 10^{-8} M (p. ej., no más de $\leq 9 \times 10^{-9}$ M, $\leq 8 \times 10^{-9}$ M, $\leq 7 \times 10^{-9}$ M, $\leq 6 \times 10^{-9}$ M, $\leq 5 \times 10^{-9}$ M, $\leq 4 \times 10^{-9}$ M, $\leq 3 \times 10^{-9}$ M, $\leq 2 \times 10^{-9}$ M, o $\leq 10^{-9}$ M) según se mide mediante ensayo de unión por resonancia de plasmón.

[0093] En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a PD-1 de mono a una EC_{50} de no más de 100 nM o no más de 10nM (p. ej., no más de 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM, o 1nM.). En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos no se unen a PD-1 de ratón, sino que se unen a PD-1 de mono con una afinidad de unión similar a la de PD-1 humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos inhiben potentemente la unión de PD-1 humana o de mono a su ligando (p. ej., PD-L1 o PD-L2), a una IC_{50} de no más de 100 nM (p. ej., no más de 50nM, 40nM, 30nM, 20nM, 10 nM, 9nM, 8nM, 7nM, 6nM, 5nM, 4nM, 3nM, 2nM, 1 nM, 0,9nM, 0,8nM, 0,7nM, 0,6nM, 0,5nM, 0,4nM, 0,3nM, 0,2nM, o 0,1nM). En ciertas realizaciones, la EC_{50} o IC_{50} se mide mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

[0094] En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento se unen a PD-1 humana con una EC_{50} (es decir, concentración de unión del 50%) de 0,1nM-100nM (p. ej., 0,1nM-50nM, 0,1nM-30nM, 0,1nM-20nM, 0,1nM-10nM o 0,1nM-1nM). La unión de los anticuerpos a PD-1 humana puede medirse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, ensayo sándwich como ELISA, inmunoelectrotransferencia, FACS u otro ensayo de unión. En un ejemplo ilustrativo, se permite que el anticuerpo de prueba (es decir, el primer anticuerpo) se una a la PD-1 humana inmovilizada o a las células que expresan PD-1 humana y, tras lavar el anticuerpo no unido, se introduce un anticuerpo secundario marcado que puede unirse al primer anticuerpo unido y permitir así su detección. La detección puede realizarse con un lector de microplacas cuando se utiliza PD-1 inmovilizada, o mediante análisis FACS cuando se utilizan células que expresan PD-1 humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento se unen a PD-1 humana con una EC_{50} (es decir, una concentración efectiva del 50%) de 1nM a 10nM, o de 1nM a 5nM según lo medido por análisis FACS.

[0095] En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de los mismos aquí proporcionados inhiben la unión de PD-1 humana a su ligando a una IC_{50} de 0,2nM-100nM (p. ej., 0,2nM-50nM, 0,2nM-30nM, 0,2nM-20nM, 0,2nM-10nM, o 1nM-10nM), medida en un ensayo de competición.

[0096] En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento bloquean la unión de PD-1 humana a su ligando y, por lo tanto, proporcionan actividad biológica que incluye, por ejemplo, inducir la producción de citocinas de las células T activadas (como células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$), inducir la proliferación de células T activadas (como células T $CD4^+$ y células T $CD8^+$) e invertir la función supresora de T reg. Algunos ejemplos de citocinas son la IL-2 y el IFN γ . El término "IL-2" hace referencia a la interleucina 2, un tipo de molécula señalizadora de citoquinas del sistema inmunitario que regula las actividades de los glóbulos blancos (p. ej., los leucocitos). El término "interferón gamma (IFN γ)" es una citocina producida por las células asesinas naturales (NK), las células T NK y las células T $CD4^+$ y $CD8^+$, que es un activador crítico de los macrófagos e inductor de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La producción de citoquinas puede determinarse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante ELISA. También pueden utilizarse métodos para detectar la proliferación de células T, como el ensayo de incorporación de [^3H]timidina.

[0097] Los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos son específicos para PD-1. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos no se unen a CD28 y/o CTLA-4. Por ejemplo, la afinidad de unión con CD28 y/o CTLA-4 es inferior al 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de la afinidad con PD-1.

[0098] En ciertas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a PD-1 de mono a una EC_{50} de no más de 100nM, por ejemplo, no más de o aproximadamente 10 nM, 9 nM, 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,9nM, 0,8nM, 0,7nM, 0,6nM, 0,5nM, 0,4nM, 0,3nM, 0,2nM, 0,1nM, 0,09nM, 0,08nM, 0,07nM, 0,06nM, 0,05nM, 0,04nM, 0,03nM, 0,02nM, o 0,01nM, según ELISA. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen a PD-1 de mono a una EC_{50} de aproximadamente 1 nM -10nM.

[0099] En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos no se unen a PD-1 de ratón, sino que se unen a PD-1 de mono con una afinidad de unión similar a la de PD-1 humana. Por ejemplo, la unión de los anticuerpos ejemplares hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.103.11-v2, hAb 1.139.15, o hAb 1.153.7 a PD-1 de ratón no es detectable en ensayos de unión convencionales como ELISA, o análisis FACS, mientras que la unión de estos anticuerpos a PD-1 de mono tiene una afinidad o valor EC50 similar a la de PD-1 humana medida por ELISA o FACS.

[0100] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos tienen una función efectora reducida o agotada. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos tienen una región constante de isotipo IgG4, que tiene una función efectora reducida o agotada. Las funciones efectoras como ADCC y CDC pueden conducir a la citotoxicidad de las células que expresan PD-1. Muchas células, como las células T, expresan normalmente PD-1. Con el fin de evitar la toxicidad potencial no deseada para esas células normales, ciertas formas de realización de los anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos proporcionados en el presente documento pueden poseer funciones efectoras reducidas o incluso agotadas. Se conocen varios ensayos para evaluar las actividades ADCC o CDC, por ejemplo, el ensayo de unión a receptores Fc, el ensayo de unión a C1q y el ensayo de lisis celular, y pueden seleccionarse fácilmente por los expertos en la materia. Sin querer ceñirnos a la teoría, pero se cree que los anticuerpos con funciones efectoras reducidas o agotadas, como ADCC o CDC, no causarían citotoxicidad o la causarían en grado mínimo a las células que expresan PD-1, por ejemplo, esas células T, y por lo tanto las librarían de efectos secundarios no deseados, mientras que mientras tanto, el bloqueo de PD-1 potenciaría el sistema inmunitario para el tratamiento de afecciones como el cáncer o la infección crónica.

[0101] En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento tienen efectos secundarios reducidos. Por ejemplo, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento pueden tener una secuencia IgG totalmente humana y, por lo tanto, una inmunogenicidad menor que la de un anticuerpo homólogo humanizado. Por otro ejemplo, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento pueden estar en formato IgG4 para eliminar la ADCC y la CDC.

[0102] En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento son ventajosos en el sentido de que pueden utilizarse en combinación con agentes inmunogénicos, tales como células tumorales, antígeno tumoral purificado y células transfectadas con genes que codifican citoquinas inmunoestimulantes, vacunas tumorales. Además, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden incluirse en terapias combinadas, incluidas las quimio y radioterapias estándar, las terapias de moléculas pequeñas basadas en dianas y otras terapias emergentes de moduladores de puntos de control inmunitarios. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos pueden utilizarse como base de conjugados anticuerpo-fármaco, anticuerpos biespecíficos o multivalentes.

[0103] Los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos aquí proporcionados pueden ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo totalmente humano, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico, anticuerpo recombinante, anticuerpo biespecífico, anticuerpo marcado, anticuerpo bivalente o anticuerpo antiidiotípico. Un anticuerpo recombinante es un anticuerpo preparado in vitro mediante métodos recombinantes y no en animales. Un anticuerpo biespecífico o bivalente es un anticuerpo artificial que tiene fragmentos de dos anticuerpos monoclonales diferentes y puede unirse a dos antígenos distintos. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que sea "bivalente" comprende dos sitios de unión a antígeno. Los dos sitios de unión al antígeno pueden unirse al mismo antígeno, o cada uno puede unirse a un antígeno diferente, en cuyo caso el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se caracteriza como "biespecífico".

[0104] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento son anticuerpos totalmente humanos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos totalmente humanos se preparan utilizando métodos recombinantes. Por ejemplo, se puede hacer que un animal transgénico, como un ratón, sea portador de transgenes o transcromosomas de genes de inmunoglobulina humana y, por tanto, capaz de producir anticuerpos totalmente humanos tras la inmunización con un antígeno adecuado, como la PD-1 humana. Los anticuerpos totalmente humanos pueden aislarse de dicho animal transgénico o, alternativamente, pueden fabricarse mediante tecnología de hibridoma fusionando las células del bazo del animal transgénico con una línea celular inmortal para generar células de hibridoma que segreguen los anticuerpos totalmente humanos. Los animales transgénicos ejemplares incluyen, sin limitación, OmniRat, cuya expresión endógena de genes de inmunoglobulina de rata se inactivan y al mismo tiempo se diseñan para contener loci de inmunoglobulina humana recombinante funcional; OmniMouse, cuya expresión endógena de genes de inmunoglobulina de ratón se inactivan y al mismo tiempo se diseñan para contener loci de inmunoglobulina humana recombinante con delección del locus J y una mutación C-kappa; OmniFlic, que es una rata transgénica cuya expresión endógena de genes de inmunoglobulina de rata están inactivados y al mismo tiempo diseñados para contener loci de inmunoglobulina humana recombinante con una única cadena ligera VkJk común reordenada y una cadena pesada funcional. Encontrará información más detallada en: Osborn M. et al, Journal of Immunology, 2013, 190: 1481-90; Ma B. et al, Journal of Immunological Methods 400 - 401 (2013) 78-86; Geurts A. et al, Science, 2009, 325:433; Pat. de EE. UU. 8.907.157; Patente EP 2152880B1; Patente EP 2336329B1. También pueden utilizarse otros animales transgénicos adecuados, por ejemplo, ratones HuMab (véase, para más detalles, Lonberg, N. et al. Nature 368(6474): 856 859 (1994)), Xeno-Mouse (Mendez et al. Nat Genet, 1997, 15:146-156), TransChromo Mouse

(Ishida et al. Cloning Stem Cells, 2002, 4:91-102) y VelocImmune Mouse (Murphy et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111:5153-5158), Kymouse (Lee et al. Nat Biotechnol, 2014, 32:356-363), y conejo transgénico (Flisikowska et al. PLoS One, 2011, 6:e21045).

[0105] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos son un diacuerpo, un scFv, un dímero scFv, un BsFv, un dsFv, un (dsFv)₂, un dsFv-dsFv', un fragmento Fv, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, o un diacuerpo ds.

[0106] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden además una región constante de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, una región constante de inmunoglobulina comprende una cadena pesada y/o una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena pesada comprende regiones CH1, CH1-CH2 o CH1-CH3. En algunas realizaciones, la región constante puede comprender además una o más modificaciones para conferir propiedades deseables. Por ejemplo, la región constante puede modificarse para reducir o agotar una o más funciones efectoras, para mejorar la unión al receptor FcRn o para introducir uno o más residuos de cisteína.

[0107] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden además un conjugado. Se contempla que una variedad de conjugados puede unirse a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno proporcionados en el presente documento (véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, Nueva York, (1989)). Estos conjugados pueden unirse a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos mediante unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión por coordenadas, complejación, asociación, mezcla o adición, entre otros métodos. En ciertas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno aquí descritos pueden diseñarse para contener sitios específicos fuera de la porción de unión al epítipo que pueden utilizarse para la unión a uno o más conjugados. Por ejemplo, dicho sitio puede incluir uno o más residuos de aminoácidos reactivos, como por ejemplo residuos de cisteína o histidina, para facilitar la unión covalente a un conjugado. En ciertas realizaciones, los anticuerpos pueden estar unidos a un conjugado indirectamente, o a través de otro conjugado. Por ejemplo, el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno pueden conjugarse con biotina y, a continuación, conjugarse indirectamente con un segundo conjugado que se conjuga con avidina. El conjugado puede ser una marcación detectable, una fracción modificadora farmacocinética, una fracción de purificación o una fracción citotóxica. Los ejemplos de marcaciones detectables pueden incluir marcaciones fluorescentes (p. ej., fluoresceína, rodamina, dansilo, ficoeritrina o rojo Texas), marcaciones de sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, luciferasas, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas o β -D-galactosidasa), radioisótopos (p. ej., ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H, ¹¹¹In, ¹¹²In, ¹⁴C, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁶Y, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ²¹¹At, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, y ³²P, otros lantánidos, marcaciones luminiscentes), fracción cromofórica, digoxigenina, biotina/avidina, una molécula de ADN u oro para la detección. En ciertas realizaciones, el conjugado puede ser una fracción modificadora farmacocinética, como el PEG, que ayuda a aumentar la semivida del anticuerpo. Otros polímeros adecuados son, por ejemplo, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol y similares. En ciertas realizaciones, el conjugado puede ser una fracción de purificación, como una esfera magnética. Una "fracción citotóxica" puede ser cualquier agente que sea perjudicial para las células o que pueda dañarlas o matarlas. Ejemplos de fracción citotóxica incluyen, sin limitación, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina, diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina y análogos de los mismos, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (p. ej., mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (p. ej., vincristina y vinblastina).

Polinucleótidos y Métodos Recombinantes

[0108] En el presente documento se divulgan además polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los polinucleótidos aislados pueden comprender una o más secuencias nucleotídicas como las mostradas en la Tabla 1, que codifican las secuencias CDR proporcionadas en la Tabla 1.

[0109] Los polinucleótidos aislados del segundo aspecto de la presente invención codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos del primer aspecto de la presente invención.

[0110] En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican una región variable de cadena pesada y comprenden una secuencia de SEQ ID N.º: 54. En algunas realizaciones, los polinucleótidos aislados codifican una región variable de cadena ligera y comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID N.º: 56, y SEQ ID N.º: 68.

[0111] El polinucleótido aislado que codifica los anticuerpos anti-PD-1 y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos

(p. ej., incluyendo las secuencias de la Tabla 1) puede insertarse en un vector para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para su expresión, utilizando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. En otra realización, el anticuerpo puede producirse por recombinación homóloga conocida en la técnica. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y secuenciar fácilmente mediante procedimientos convencionales (p. ej., utilizando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Hay muchos vectores disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor (por ejemplo, SV40, CMV, EF-1 α) y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0112] En algunas realizaciones, el sistema vectorial incluye sistemas de mamíferos, bacterias, levaduras, etc., y comprende plásmidos tales como, pero no limitados a, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pCMV, pEGFP, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS420, pLexA, pACT2.2, etc., y otros vectores de laboratorio y comerciales. Los vectores adecuados pueden incluir, plásmidos o vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados).

[0113] Los vectores que comprenden la secuencia polinucleotídica que codifica el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno pueden introducirse en una célula huésped para clonación o expresión génica. Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores aquí descritos son las células procariotas, de levadura o eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*.

[0114] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, como los hongos filamentosos o la levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos anti-PD-1. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más utilizado entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* hospedadores como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* hospedadores como *A. nidulans* y *A. niger*.

[0115] Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glicosilados o antígenos-fragmento aquí proporcionados se derivan de organismos multicelulares. Algunos ejemplos de células invertebradas son las células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras permisivas de insectos de hospedadores como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (fruitfly) y *Bombyx mori*. Se dispone públicamente de una variedad de cepas virales para transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden utilizarse como el virus aquí presente según la presente invención, en particular para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*. También pueden utilizarse como hospedadores cultivos celulares de plantas de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

[0116] Sin embargo, el interés ha sido mayor en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfala (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Anales N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). En algunas realizaciones preferibles, la célula huésped es la célula 293F.

[0117] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos anti-PD-1 y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0118] Las células huésped utilizadas para producir los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aquí proporcionados pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios disponibles en el mercado, como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), (Sigma) son adecuados para el cultivo de las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz.

58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), Pat. de EE. UU. N.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o Pat. de EE. UU. Re. 30.985 puede utilizarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos generalmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro suplemento necesario en las concentraciones adecuadas que conozcan los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, el pH y similares, son las que se han utilizado previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

[0119] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, se eliminan los restos particulados, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de E. coli. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante unos 30 min. Los restos celulares pueden eliminarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión suelen concentrarse primero utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de los pasos anteriores puede incluirse un inhibidor de la proteasa, como el PMSF, para inhibir la proteólisis, y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

[0120] El anticuerpo preparado a partir de las células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de intercambio iónico DEAE-celulosa, precipitación con sulfato de amonio, salado y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos basados en cadenas pesadas gamma.1, gamma.2 o gamma.4 humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para el humano gamma.3 (Guss et al., EMBO J. 5:1567 1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad suele ser agarosa, pero existen otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como el vidrio de poro controlado o el poli(estirenedivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden conseguir con la agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX.TM. (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También se dispone de otras técnicas para la purificación de proteínas, como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC de fase inversa, la cromatografía sobre sílice, la cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, la cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), el cromatofoco, el SDS-PAGE y la precipitación con sulfato de amonio, en función del anticuerpo que se desee recuperar.

[0121] Después de cual(es)quier etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrofóbica de bajo pH utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizado a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25M de sal).

Kits

[0122] La presente divulgación proporciona kits que comprenden los anticuerpos anti-PD-1 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En algunas realizaciones, los kits son útiles para detectar la presencia o el nivel de PD-1 en una muestra biológica. La muestra biológica puede comprender una célula o un tejido.

[0123] En algunas realizaciones, el kit comprende un anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno del mismo que se conjuga con una marcación detectable. En algunas otras realizaciones, el kit comprende un anticuerpo anti-PD-1 no marcado o un fragmento de unión a antígeno, y comprende además un anticuerpo secundario marcado que es capaz de unirse al anticuerpo anti-PD-1 no marcado. El kit puede comprender además unas instrucciones de uso, y un envase que separa cada uno de los componentes del kit.

[0124] En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o el fragmento de unión a antígeno del mismo se asocian con un sustrato o un dispositivo útil en un ensayo sándwich como ELISA, o en un ensayo inmunográfico. El sustrato o dispositivo útil puede ser, por ejemplo, una placa de microtitulación y una tira reactiva.

Composición Farmacéutica y Método de Tratamiento

[0125] La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-PD-1 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

[0126] Los portadores farmacéuticamente aceptables para su uso en las composiciones farmacéuticas aquí divulgadas pueden incluir, por ejemplo, portadores farmacéuticamente aceptables líquidos, en gel o sólidos, vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos, agentes de suspensión/disolución, agentes secuestrantes o quelantes, diluyentes, adyuvantes, excipientes o sustancias auxiliares no tóxicas, otros componentes conocidos en la técnica, o diversas combinaciones de los mismos.

[0127] Los componentes adecuados pueden incluir, por ejemplo, antioxidantes, cargas, aglutinantes, desintegrantes, tampones, conservantes, lubricantes, aromatizantes, espesantes, colorantes, emulsionantes o estabilizantes como azúcares y ciclodextrinas. Los antioxidantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metionina, ácido ascórbico, EDTA, tiosulfato sódico, platino, catalasa, ácido cítrico, cisteína, tioglicerol, ácido tioglicólico, tiosorbitol, butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno y/o galato de propilo. Tal como se describe en el presente documento, la inclusión de uno o más antioxidantes, como la metionina, en una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y conjugados, tal como se proporciona en el presente documento, disminuye la oxidación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Esta reducción de la oxidación evita o reduce la pérdida de afinidad de unión, mejorando así la estabilidad del anticuerpo y maximizando su vida útil. Por lo tanto, en ciertas realizaciones se proporcionan composiciones que comprenden uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos según se divulga en el presente documento y uno o más antioxidantes como la metionina. Además, se proporcionan métodos para prevenir la oxidación, prolongar la vida útil y/o mejorar la eficacia de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como se proporciona en el presente documento, mezclando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno con uno o más antioxidantes, como la metionina.

[0128] Para ilustrar aún más, los vehículos farmacéuticos aceptables pueden incluir, por ejemplo, vehículos acuosos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, o inyección de dextrosa y Ringer lactato, vehículos no acuosos como aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo o aceite de cacahuete, agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas, agentes isotónicos como cloruro sódico o dextrosa, tampones como tampones de fosfato o citrato, antioxidantes como el bisulfato sódico, anestésicos locales como el clorhidrato de procaína, agentes de suspensión y dispersión como la carboximetilcelulosa sódica, la hidroxipropilmetilcelulosa o la polivinilpirrolidona, agentes emulsionantes como el polisorbato 80 (TWEEN-80) agentes secuestrantes o quelantes como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o EGTA (ácido etilenglicol tetraacético), alcohol etílico, polietilenglicol, propilenglicol, hidróxido sódico, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico. Los agentes antimicrobianos utilizados como portadores pueden añadirse a las composiciones farmacéuticas en envases de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres metílicos y propílicos del ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Los excipientes adecuados pueden incluir, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Las sustancias auxiliares no tóxicas adecuadas pueden incluir, por ejemplo, agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampones del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad o agentes como acetato sódico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina o ciclodextrina.

[0129] Las composiciones farmacéuticas pueden ser una solución líquida, suspensión, emulsión, píldora, cápsula, comprimido, formulación de liberación sostenida o polvo. Las formulaciones orales pueden incluir portadores estándar como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinil pirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

[0130] En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan en una composición inyectable. Las composiciones farmacéuticas inyectables pueden prepararse en cualquier forma convencional, como por ejemplo solución líquida, suspensión, emulsión, o formas sólidas adecuadas para generar solución líquida, suspensión o emulsión. Los preparados para inyección pueden incluir soluciones estériles y/o no pireticas listas para inyección, productos secos solubles estériles, como polvos liofilizados, listos para ser combinados con un disolvente justo antes de su uso, incluyendo comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos secos insolubles estériles listos para ser combinados con un vehículo justo antes de su uso, y emulsiones estériles y/o no pireticas. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

[0131] En ciertas realizaciones, las preparaciones parenterales de dosis unitaria se envasan en una ampolla, un vial o una jeringa con aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral deben ser estériles y no pireticas, como es conocido y practicado en la técnica.

[0132] En ciertas realizaciones, se prepara un polvo liofilizado estéril disolviendo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se describe en el presente documento en un disolvente adecuado. El disolvente puede contener un excipiente que mejore la estabilidad u otros componentes farmacológicos del polvo o de la solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que pueden utilizarse incluyen, entre otros, agua, dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El disolvente puede contener un tampón, como citrato, fosfato sódico o potásico u otro tampón conocido por los expertos en la materia, con un pH aproximadamente neutro. La posterior filtración estéril de la solución seguida de liofilización en condiciones estándar conocidas por los expertos en la materia proporciona una formulación deseable. En una realización, la solución resultante se repartirá en viales para su liofilización. Cada vial puede contener una dosis única o múltiples dosis del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo o composición del mismo. El sobrellenado de los viales con una pequeña cantidad por encima de la necesaria para una dosis o conjunto de dosis (por ejemplo, alrededor del 10%) es aceptable

para facilitar la extracción precisa de la muestra y la dosificación exacta. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones adecuadas, por ejemplo, entre 4 °C y temperatura ambiente.

[0133] La reconstitución de un polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para su uso en administración parenteral. En una realización, para la reconstitución se añade al polvo liofilizado agua estéril y/o no pirética u otro portador líquido adecuado. La cantidad exacta depende de la terapia seleccionada que se administre, y puede determinarse empíricamente.

[0134] También se proporcionan métodos terapéuticos, que comprenden: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tal como se proporciona en el presente documento a un sujeto que lo necesite, tratando o previniendo así una afección o un trastorno asociado con relacionado con la PD-1. En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar una afección en un sujeto que se beneficiaría de la regulación ascendente de la respuesta inmunitaria, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según se proporciona en el presente documento a un sujeto que lo necesite.

[0135] La cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como se proporciona en el presente documento, dependerá de diversos factores conocidos en la técnica, como por ejemplo el peso corporal, la edad, los antecedentes médicos, la medicación actual, el estado de salud del sujeto y el potencial de reacción cruzada, alergias, sensibilidades y efectos secundarios adversos, así como la vía de administración y el grado de desarrollo tumoral. Un experto en la materia (por ejemplo, un médico o un veterinario) puede reducir o aumentar proporcionalmente las dosis según lo indiquen estas y otras circunstancias o requisitos.

[0136] En ciertas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según se proporciona en el presente documento puede administrarse a una dosis terapéuticamente eficaz de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg (p. ej., aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, o aproximadamente 100 mg/kg). En algunas de estas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se administra a una dosis de aproximadamente 50 mg/kg o menos, y en algunas de estas realizaciones la dosis es de 10 mg/kg o menos, 5 mg/kg o menos, 1 mg/kg o menos, 0,5 mg/kg o menos, o 0,1 mg/kg o menos. En ciertas realizaciones, la dosis de administración puede cambiar a lo largo del tratamiento. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la dosis de administración inicial puede ser mayor que las dosis de administración posteriores. En ciertas realizaciones, la dosis de administración puede variar a lo largo del tratamiento en función de la reacción del sujeto.

[0137] Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una dosis única o varias dosis divididas a lo largo del tiempo.

[0138] Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno aquí descritos pueden administrarse por cualquier vía conocida en la técnica, como por ejemplo vías parenterales (p. ej., subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, incluida la infusión intravenosa, intramuscular o inyección intradérmica) o no parenterales (p. ej., oral, intranasal, intraocular, sublingual, rectal o tópica).

[0139] Las afecciones y trastornos asociados con PD-1 pueden ser enfermedades o trastornos relacionados con el sistema inmunitario. En ciertas realizaciones, las afecciones y trastornos asociados a PD-1 incluyen tumores y cánceres, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas, carcinoma gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, mesotelioma, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, sarcoma, cáncer de próstata, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, carcinoma tímico, leucemia, linfomas, mielomas, micosis fungoide, cáncer de células de Merkel, y otras neoplasias hematológicas, como el linfoma de Hodgkin clásico (CHL), el linfoma mediastínico primario de grandes células B, el linfoma de células B ricas en células T/histiocitos, PTLD positivo y negativo para el EBV y linfoma difuso de grandes células B (DLBCL) asociado al EBV, linfoma plasmablastico, linfoma extraganglionar de células NK/T, carcinoma nasofaríngeo y linfoma de efusión primaria asociado al HHV8, linfoma de Hodgkin, neoplasia del sistema nervioso central (CNS), como linfoma primario del CNS, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico. En ciertas realizaciones, los tumores y cánceres son metastásicos, especialmente los tumores metastásicos que expresan PD-L1. En ciertas realizaciones, las afecciones y trastornos asociados a la PD-1 incluyen enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico (SLE), la psoriasis, la esclerodermia sistémica, la diabetes autoinmune y similares. En ciertas realizaciones, las afecciones y trastornos asociados a PD-1 incluyen enfermedades infecciosas tales como infección vírica crónica, por ejemplo, infección vírica de hepatitis B, hepatitis C, virus del herpes, virus de Epstein-Barr, VIH, citomegalovirus, virus del herpes simple tipo 1, virus del herpes simple tipo 2, virus del papiloma humano, adenovirus, epidemias de virus del herpes asociadas al sarcoma de Kaposi West, virus del anillo fino (Torquetenovirus), virus JC o virus BK.

Métodos de uso

[0140] En el presente documento se describen métodos para utilizar los anticuerpos anti-PD-1 o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

5 **[0141]** Por ejemplo, se divulgan métodos para tratar una afección o un trastorno asociado o relacionado con PD-1 en un individuo, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo. El individuo puede haber sido identificado como portador de un trastorno o afección susceptible de responder a un antagonista de PD-1.

10 **[0142]** La presencia o nivel de PD-L1 en una muestra biológica interesada puede ser indicativa de si el individuo del que se deriva la muestra biológica podría responder probablemente a un antagonista de PD-1. Se pueden utilizar varios métodos para determinar la presencia o el nivel de PD-L1 en una muestra biológica de ensayo del individuo. Por ejemplo, la muestra biológica de ensayo puede exponerse a un anticuerpo anti-PD-L1 o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la proteína PD-L1 expresada y la detecta. Alternativamente, el PD-L1 también puede detectarse a
15 nivel de expresión de ácido nucleico, utilizando métodos como qPCR, PCR de transcriptasa inversa, microarrays, SAGE, FISH y similares. La muestra de la prueba puede proceder de una célula o tejido canceroso, o de células inmunitarias infiltradas en el tumor. La presencia o el nivel de regulación positiva de PD-L1 en la muestra biológica de ensayo puede indicar la probabilidad de respuesta. El término "con regulación positiva", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un aumento global no inferior al 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,
20 80% o superior, en el nivel de proteína de PD-L1 en la muestra de ensayo detectado utilizando los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno proporcionados en el presente documento, en comparación con el nivel de proteína de PD-L1 en una muestra de referencia detectado utilizando el mismo anticuerpo. La muestra de referencia puede ser una muestra de control obtenida de un individuo sano o no enfermo, o una muestra sana o no enferma obtenida del mismo individuo del que se obtiene la muestra problema. Por ejemplo, la muestra de referencia puede ser una muestra no
25 enferma adyacente o próxima a la muestra problema (por ejemplo, un tumor).

[0143] Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aquí divulgados pueden administrarse solos o en combinación con uno o más medios o agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aquí divulgados pueden administrarse en combinación con quimioterapia, radioterapia, cirugía para el tratamiento del
30 cáncer (por ejemplo, tumorectomía), uno o más antieméticos u otros tratamientos para las complicaciones derivadas de la quimioterapia, o cualquier otro agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer o cualquier trastorno médico mediado por PD-1. En ciertos ejemplos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tal como se describe en el presente documento que se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales puede administrarse simultáneamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, y en algunos de estos ejemplos el anticuerpo o
35 fragmento de unión a antígeno y el agente o agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse como parte de la misma composición farmacéutica. Sin embargo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno administrado "en combinación" con otro agente terapéutico no tiene por qué administrarse simultáneamente o en la misma composición que el agente. Se considera que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno administrado antes o después de otro agente se administra "en combinación" con dicho agente, tal como se utiliza esta expresión en el presente documento, incluso si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y el segundo agente se administran por vías diferentes. Cuando
40 sea posible, los agentes terapéuticos adicionales administrados en combinación con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno aquí descritos se administrarán según el programa indicado en la ficha técnica del agente terapéutico adicional, o según el Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57ª edición (noviembre de 2002)) o protocolos bien conocidos en la técnica.

45 **[0144]** En ciertos ejemplos, los agentes terapéuticos pueden inducir o potenciar la respuesta inmunitaria contra el cáncer. Por ejemplo, se puede utilizar una vacuna tumoral para inducir una respuesta inmunitaria frente a determinado tumor o cáncer. La terapia con citocinas también puede utilizarse para mejorar la presentación del antígeno tumoral al sistema inmunitario. Ejemplos de terapia de citoquinas incluyen, sin limitación, interferones como interferón- α , - β , y - γ , factores
50 estimulantes de colonias como CSF de macrófagos, CSF de granulocitos-macrófagos, y CSF de granulocitos, interleuquinas como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, y IL-12, factores de necrosis tumoral como TNF- α y TNF- β . También pueden utilizarse agentes que inactiven las dianas inmunosupresoras, por ejemplo, inhibidores del TGF- β , inhibidores de la IL-10 e inhibidores del ligando Fas. Otro grupo de agentes incluye los que activan la respuesta inmunitaria a las células tumorales o cancerosas, por ejemplo, los que potencian la activación de las
55 células T (por ejemplo, agonistas de moléculas coestimuladoras de células T como CTLA-4, ICOS y OX-40), y los que potencian la función de las células dendríticas y la presentación de antígenos.

[0145] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada.

60 **EJEMPLO 1: Generación de hibridomas de anticuerpos**

[0146] 1.1 Generación de inmunógenos: Se sintetizaron ADNs que codifican PD-1 y PD-L1 ECD o de longitud completa y se insertaron en el vector de expresión pcDNA3.3. Max-prep los ADN plásmidos y las secuencias de ADN insertadas se verificaron mediante secuenciación. Las proteínas de fusión PD-1 ECD y PD-L1 ECD que contienen diversas marcaciones, incluidas marcaciones Fc humanas, Fc de ratón e His, se obtuvieron mediante transfección del gen PD-1 ECD humano en células CHO-S o HEK293. Después de 5 días, los sobrenadantes cosechados del cultivo de células transfectadas

transitoriamente se utilizaron para la purificación de proteínas. Las proteínas de fusión se purificaron y cuantificaron para su uso en inmunización y cribado.

[0147] 1.2 Establecimiento de líneas celulares estables. Con el fin de obtener herramientas para el cribado y la validación de anticuerpos, generamos líneas celulares transfectantes de PD-1 y PD-L1. Brevemente, se transfectaron células CHO-K1, 293F o Ba/F3 con el vector de expresión pCND3.3 que contenía PD-1 o PD-L1 de longitud completa utilizando el kit de transfección Lipofectamine 2000 según el protocolo del fabricante. A las 48-72 horas después de la transfección, las células transfectadas se cultivaron en medio que contenía Blasticidina o G418 para la selección. Con el tiempo, esto seleccionará las células que han incorporado de forma estable los genes PD-1 o PD-L1 en su ADN genómico. Mientras tanto, se comprobó la expresión de los genes interesados PD-1 y PD-L1 en las células. Una vez verificada la expresión, se recogieron clones individuales de interesados mediante dilución limitada y se escalaron a grandes volúmenes. A continuación, las líneas celulares monoclonales establecidas se mantuvieron en un medio que contenía dosis más bajas de los antibióticos Blasticidin o G418.

1.3 Generación de hibridomas de anticuerpos.

[0148] 1.3.1 Inmunización y fusión celular: Las ratas OMT (obtenidas de Open Monoclonal Technology, Inc., Palo Alto, US), de 8-10 semanas de edad, fueron inmunizadas con 10µg de proteína PD-1 ECD humana en TiterMax en la almohadilla de la pata para el primer refuerzo, repitiendo la inmunización cada 3 días con proteína PD-1 ECD en Aluminio. Ratas sangradas cada dos semanas para la recogida de suero y los títulos de anticuerpos se midieron por ELISA o ensayo FACS. Cuando el título de anticuerpos alcanzó un nivel suficientemente alto, se administró a las ratas un refuerzo final sin adyuvante (en su lugar se añadieron 100µl de 1XPBS) y se realizó la fusión celular de la siguiente manera: Los linfocitos B aislados de los ganglios linfáticos de las ratas OMT inmunizadas se combinaron con células de mieloma (en proporción 1:1). La mezcla de células se lavó y se suspendió con 5-10 ml de solución ECF. Añadir solución ECF para ajustar la concentración a 2×10^6 células/ml. Tras la fusión celular electrónica, la suspensión celular de la cámara de fusión se transfirió inmediatamente a un tubo estéril que contenía más volumen de medio. Tras incubar durante más de 24 horas a 37 °C, se mezcló la suspensión celular y se pipeteó en placas de 96 pocillos ($0,5 \times 10^6$ células/placa). Las células se incubaron a 37°C, 5% CO₂. Cuando los clones hayan crecido lo suficiente, transfiera 100µl de sobrenadante de las placas de 96 pocillos para ensayar el cribado de anticuerpos.

[0149] 1.3.2 Primer cribado y cribado de confirmación de sobrenadantes de hibridoma: El ensayo ELISA se utilizó como primer método de cribado para comprobar la unión de los sobrenadantes de hibridoma a la proteína PD-1. Brevemente, las placas (Nunc) se recubrieron con proteína soluble del dominio extracelular PD-1 humano a 1 µg/ml durante toda la noche a 4 °C. Tras bloquear y lavar, los sobrenadantes de hibridoma se transfirieron a las placas recubiertas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se lavaron las placas y se incubaron con anticuerpos secundarios IgG1 HRP de cabra contra rata (Bethyl) e IgG2b HRP de cabra contra rata (Bethyl) durante 45 minutos. Tras el lavado, se añadió sustrato TMB y se detuvo la interacción con HCl 2M. La absorbancia a 450 nm se leyó con un lector de microplacas (Molecular Device). Para confirmar la unión nativa de los anticuerpos PD-1 sobre las moléculas PD-1 conformacionales expresadas en la membrana celular, se realizó un análisis FACS en la línea celular CHO-S transfectada con PD-1. Las células CHO-S que expresan PD-1 humana se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en U (BD) a una densidad de 1×10^6 células/ml. A continuación, los sobrenadantes de hibridoma se transfirieron a las placas y se incubaron durante 1 h a 4 °C. Tras lavar con 1XPBS/1%BSA, se aplicó el anticuerpo FITC secundario de cabra anti rata (Jackson Immunoresearch Lab) y se incubó con las células a 4 °C en la oscuridad durante 1 h. A continuación, las células se lavaron y resuspendieron en 1XPBS/1%BSA o se fijaron con paraformaldehído al 4%, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD). La unión del anticuerpo a la línea celular CHO-S parental se realizó utilizando el mismo método. La Figura 1 muestra la unión de anticuerpos anti-PD-1 humana a células CHO que expresan PD-1. Las células CHO transfectadas con PD-1 humana de longitud completa se tiñeron con anticuerpos contra PD-1 humana de hibridoma de rata, seguidos de una segunda tinción con anticuerpos Fc de cabra conjugados con FITC anti-rata-IgG y se analizaron por FACS. Los datos muestran que los anticuerpos se unen específicamente a PD-1 expresada en células CHO.

[0150] Para probar la afinidad de unión de los anticuerpos a PD-1 nativa expresada en células CD4+T humanas, se generaron células CD4+T humanas a partir de PBMC cultivadas en IL-2 y OKT3 durante 3 días y se tiñeron con los anticuerpos contra PD-1 humana. La unión de los anticuerpos al PD-1 en las células T se analizó mediante FACS. Como se muestra en la Figura 3, el análisis FACS demostró que los anticuerpos se unen especialmente a la PD-1 nativa expresada en las células CD4+T.

[0151] La comprobación de la actividad de bloqueo de los anticuerpos se utilizó como cribado de confirmación para seleccionar posibles éxitos de anticuerpos. Se comprobó la capacidad de los anticuerpos seleccionados para bloquear la unión del ligando PD-L1 a las células CHO-S transfectadas con PD-1 mediante análisis FACS. Las células CHO-S que expresan PD-1 humana se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en U (BD) a una densidad de 1×10^6 células/ml. Los anticuerpos se diluyeron en serie en tampón de lavado (1XPBS/ 1%BSA) y se incubaron con las células a 4 °C durante 1 h. Tras el lavado, se añadió la fusión Fc humana-proteína de PD-L1 humano y se incubó a 4 °C durante 1 h. El anticuerpo secundario FITC Fc anti IgG humana de cabra (sin reactividad cruzada con IgG Fc de rata, Jackson Immunoresearch Lab) se incubó con las células a 4 °C en la oscuridad durante 1 h. A continuación, las células se lavaron y resuspendieron en 1XPBS/1%BSA o se fijaron con paraformaldehído al 4%, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD).

[0152] 1.3.3 Subclonación de hibridoma: una vez que se verificó la unión específica y el bloqueo mediante el primer cribado y el cribado de confirmación, las líneas celulares de hibridoma positivas pueden utilizarse para la subclonación. Brevemente, para cada línea celular de hibridoma, se contaron las células y se diluyeron para obtener 5 células/pocillo, 1 célula/pocillo y 0,5 células/pocillo en medio de clonación. Colocar 200µl/pocillo en placas de 96 pocillos, una placa a 5 células/pocillo, una placa a 1 célula/pocillo y cuatro placas a 0,5 células/pocillo. Colocar todas las placas en la incubadora a 37 °C, 5% CO₂. Incubar hasta que todas las líneas celulares puedan comprobarse mediante ensayo ELISA.

EJEMPLO 2: Secuencia celular del hibridoma de anticuerpos y caracterización de anticuerpos totalmente humanos

[0153] 2.1 Secuencia celular de hibridoma de anticuerpos: Los ARN se aislaron de células de hibridoma monoclonal con el reactivo Trizol. La VH y VL de los anticuerpos PD-1 se amplificaron según el siguiente protocolo: brevemente, el ARN se transcribe primero inversamente en ADNc utilizando una transcriptasa inversa como se describe aquí, Sistema de reacción (20µl):

10×Tampón RT	2.0µl
25×Mezcla dNTP (100 mM)	0.8µl
10×Ceb.aleatorios RT/oligodT/ceb.especifico	2.0µl
Transcriptasa inversa MultiScribe™	1.0µl
Inhibidor de RNasa	1.0µl
ARN	2µg

H₂O sin nucleasas hasta 20,0µl

Condición de reacción

[0154]

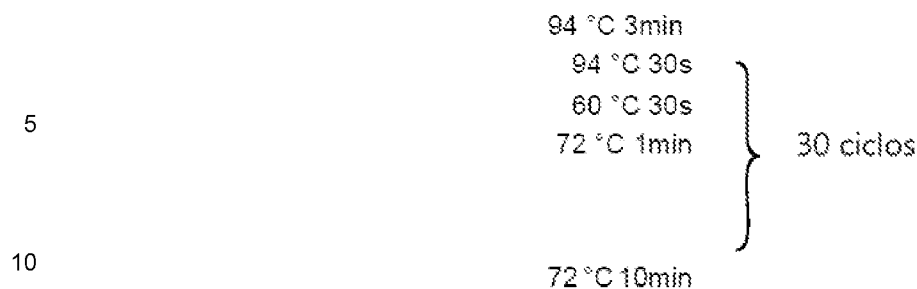
	Etap. 1	Etap. 2	Etap. 3	Et. 4
Temperatura	25	37	85	4
Tiempo	10 min	120min	5min	∞

[0155] El ADNc resultante se utiliza como plantilla para la posterior amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para los genes interesados. La reacción PCR se realizó según el siguiente procedimiento;

ADNc	1µl
Tampón PCR Ex	5µl
dNTP	2µl
ExTaq	0.5µl
P1(25pM)	0.5µl
P2(25pM)	0.5µl
ddH ₂ O	40.5µl

Condición de reacción:

[0156]



15 **[0157]** Tomar 10µl de reacción PCR para hacer la ligadura con el vector pMD18-T. Realizar la transformación de células competentes Top10 con 10µl de productos de ligación y Transferir la mezcla a las placas 2-YT+Cab precalentadas siguiendo el protocolo estándar, incubar durante la noche. Los clones positivos se comprobaron mediante PCR utilizando los cebadores M13-48 y M13-47, seguida de secuenciación.

20 **[0158]** 2.2 construcción de moléculas de anticuerpos totalmente humanas: La VH y la VL de los anticuerpos PD-1 se amplificaron como se ha descrito anteriormente. Las reacciones de PCR se purificaron con el kit de limpieza de PCR y el vector VL y pCI se digirieron con las enzimas de restricción Pme I y BssH II a 37 °C durante 2 horas. Realice las reacciones en agarosa al 1% y haga la extracción del gel con el kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Ligación de VL digerido y vector pCI según los procedimientos siguientes:

25

30

Componente	Volumen
Vector pCI	80ng
Segment.VL (inserto)	100ng
Tamp. ADN ligasa T4	1 µl
ADN ligasa T4	0.5µl
ddH ₂ O	To 10µl

35 **[0159]** La mezcla se incubó a 16 °C durante 30 minutos. se utilizaron 10µl de las reacciones para la transformación y el crecimiento de los clones. Los clones confirmados se utilizaron para la extracción del ADN del plásmido pCI-VL. A continuación, el vector pCI-VL y el fragmento VH se digirieron con XbaI y Sal I y el VH digerido purificado y el vector se ligaron con ADN ligasa T4 30 minutos a 16 °C. Una vez verificada la secuencia de VL y VH insertados mediante secuenciación, se utilizó el vector de expresión que contenía IgG entera de anticuerpo PD-1 totalmente humano para la transfección transitoria y el desarrollo de líneas celulares estables.

40 EJEMPLO 3: Caracterización de anticuerpos totalmente humanos

45 **[0160]** 3.1 Afinidad de unión de los anticuerpos PD-1 a las moléculas PD-1 de la superficie celular probada por citometría de flujo (FACS): La afinidad de unión del anticuerpo a la superficie celular PD-1 se realizó mediante análisis FACS. Las células CHO-S que expresan PD-1 humana se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en U (BD) a una densidad de 5×10^5 células/ml. Los anticuerpos analizados se diluyeron en serie 1:2 en tampón de lavado (1XPBS/ 1% BSA) y se incubaron con las células a 4 °C durante 1 h. Se añadió el anticuerpo secundario FITC Fc anti IgG humana de cabra (3,0moles FITC por mol IgG, (Jackson ImmunoResearch Lab) y se incubó a 4 °C en la oscuridad durante 1 h. A continuación, las células se lavaron una vez y se resuspendieron en 1XPBS/1%BSA, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD). La intensidad de la fluorescencia se convertirá en moléculas unidas/célula basándose en las esferas cuantitativas QuantumTM MESF Kits, Bangs Laboratories, Inc.). KD se calculó utilizando Graphpad PrismS. La Figura 2 muestra la unión de los anticuerpos PD-1 totalmente humanos (es decir, hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.139.15, y hAb 1.153.7) a la célula CHO que expresa PD-1. Se utilizaron anticuerpos totalmente humanos contra PD-1 humana para teñir las células CHO transfectadas con PD-1 y el análisis FACS muestra que los anticuerpos PD-1 totalmente humanos se unen especialmente a PD-1 con EC₅₀ de aproximadamente 2nmol/L.

55 **[0161]** El hAb 1.103.11-v2 se generó mutando un único aminoácido Asn93 (numeración de Kabat) en el anticuerpo original hAb 1.103.11 -VH(20975-VL) al residuo Serina, para reducir el riesgo de glicosilación en el residuo CDR. Aunque Asn93 se encuentra en la CDR3 de la cadena ligera, el modelo de complejo anticuerpo-antígeno generado a partir del acoplamiento computacional sugirió que Asn93 no tiene contacto directo con ningún residuo del antígeno de PD-1 humana. La mayor parte de la función de unión de la CDR3 de la cadena ligera parece ser aportada por el residuo vecino Tyr91, que tiene interacciones con algunos residuos en el bucle FG de PD-1. Los ensayos funcionales basados en células del hAb 1.103.11-v2 confirmaron que la mutación no afectaba a ninguna capacidad de unión (véanse a continuación los resultados experimentales y las Figuras 15 y 16).

65 **[0162]** La afinidad de unión del hAb 1.103.11-v2 a la PD-1 humana se midió mediante FACS y ensayo ELISA. La Figura 16 muestra la unión de los hAb 1.103.11-v2 en diferentes tampones a la célula CHO que expresa PD-1, y la unión también

se probó en las mismas condiciones que el ensayo FACS descrito anteriormente, excepto que el anticuerpo estaba en tampón de formulación o en 1xPBS (pH 7,4) y las células CHO-S que expresaban PD-1 humana se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en U (BD) a una densidad de 2×10^5 células/ml. El resultado fue comparable al del hAb 1.103.11. "hAb 1.103.11-v2 en tampón" se refiere al anticuerpo en el tampón de formulación, y "hAb 1.103.11-v2 en PBS" se refiere al anticuerpo en el 1xPBS, pH 7,4. Los anticuerpos en ambas soluciones se unieron a la PD-1 de la superficie celular en la célula CHO y no hubo diferencias significativas en la afinidad a la PD-1 humana entre las dos condiciones (para 1xPBS la EC50 fue de aproximadamente 2,52nmol/L, y para el tampón de formulación fue de aproximadamente 3,12nmol/L).

[0163] La Figura 15 muestra la unión de los hAb del anticuerpo 1.103.11-v2 a la proteína PD-1 en diferentes soluciones medida por ELISA. Siguiendo el mismo protocolo ELISA descrito anteriormente, el tiempo de incubación para el hAb 1.103.11-v2 fue de 2 h, y el tiempo de incubación para el anticuerpo secundario anti-IgG humana de cabra FcHRP (1:5000, Abcam) fue de 1 h. "hAb 1.103.11-v2 en tampón" se refiere al anticuerpo en el tampón de formulación, y "hAb 1.103.11-v2 hAb PBS" se refiere al anticuerpo en el 1xPBS, pH 7,4. Se demostró la afinidad de unión a PD-1 humana en ambas condiciones.

[0164] Las células CHO que expresan PD-1 humana se incubaron con diferentes concentraciones de los anticuerpos contra PD-1, después se añadió a las células el PD-L1 humano marcado con Fc de ratón. La unión de PD-L1 humano a la célula que expresa PD-1 se detectó utilizando IgG antiratón de cabra conjugado con FITC, seguido del análisis FACS. Como se muestra en la Figura 4, los anticuerpos contra PD-1 bloquearon la unión de PD-L1 a las células CHO transfectadas con PD-1. El hAb 1.103.11-v2 también se probó para el bloqueo de la unión de PD-L1 a células CHO transfectadas con PD-1, y el resultado fue comparable al del hAb 1.103.11.

[0165] 3.2 Afinidad de unión cinética completa probada por resonancia de plasmón superficial (SPR): Los anticuerpos se caracterizaron por afinidad y cinética de unión a PD-1 mediante ensayo SPR utilizando ProteOn XPR36 (Bio-Rad). La proteína A (Sigma) se inmovilizó en un chip sensor GLM (Bio-Rad) mediante acoplamiento amínico. Los anticuerpos purificados fluyeron sobre el chip sensor y fueron capturados por la proteína A. El chip se giró 90° y se lavó con tampón de funcionamiento (1xPBS/ 0,01% Tween20, Bio-Rad) hasta que la línea de base se estabilizó. Cinco concentraciones de PD-1 humana y tampón de funcionamiento se hicieron fluir contra la célula de flujo de anticuerpos a un caudal de 100 µL/min para una fase de asociación de 240s, seguida de una disociación de 600s. El chip se regeneró con H₃PO₄ de pH 1,7 después de cada pasada. La curva de asociación y disociación se ajustó a un modelo de unión Langmuir 1:1 utilizando el software ProteOn.

[0166] Como se muestra en la Figura 7, usando resonancia de plasmón de superficie, las afinidades de anticuerpos contra PD-1 para PD-1 humana recombinante fueron de 3.76E-9 a 1.76E-10 mol/L. Se espera que la afinidad de hAb 1.103.11-v2 sea comparable a la de 1.103.11 hAb.

3.3 Cribado de ortólogos (entre especies) y homólogos (entre familias):

[0167] 3.3.1 Reactividad cruzada a PD-1 de cynomolgus y PD-1 murina: La reactividad cruzada se midió mediante ELISA. Las placas (Nunc) se recubrieron con PD-1 de cynomolgus (Sino Biological) y PD-1 murino (Sino biological) a 1 µg/ml durante la noche a 4 °C. Después de bloquear y lavar, se añadieron anticuerpos a 1 µg/ml a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se lavaron las placas y se incubaron con anticuerpos secundarios IgG1 HRP de cabra contra rata (Bethyl) e IgG2b HRP de cabra contra rata (Bethyl) durante 45 minutos. Tras el lavado, se añadió sustrato TMB y se detuvo la interacción con HCl 2M. La absorbancia a 450 nm se leyó con un lector de microplacas (Molecular Device).

[0168] El resultado del experimento entre especies demuestra que los anticuerpos contra PD-1 se unen a PD-1 de mono cynomolgus pero no se unen a PD-1 murina (Figura 6). Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

[0169] 3.3.2 Reactividad cruzada con los miembros de la familia PD-1 CD28, CTLA4 e ICOS: para examinar la actividad de unión entre familias de los anticuerpos totalmente humanos, las líneas celulares que expresan PD-1, CD28, CTLA4 o ICOS se tiñeron con los anticuerpos, seguido de una 2ª tinción con anticuerpos Fc anti-IgG humana de cabra conjugada con FITC. Las células que expresaban PD-1 se utilizaron como control positivo. Las líneas celulares parentales correspondientes se utilizaron como controles negativos. Las células teñidas se analizaron utilizando un BD Biosciences FACSCanto II y el software FlowJo Version.

[0170] La Figura 5 muestra que células CHO transfectadas con PD-1, CD28 y 293F transfectadas con CTLA4 fueron teñidas con anticuerpos contra PD-1 y analizadas por FACS. El resultado demuestra que los anticuerpos PD-1 se unen específicamente a PD-1, pero no a CD28 y CTLA4 de la familia PD-1. Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

3.4 Prueba de clasificación de epítomos:

[0171] 3.4.1 El epítipo de unión de los anticuerpos PD-1 se comparó con el anticuerpo de referencia A y B mediante ensayo SPR utilizando ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Los anticuerpos de referencia A y B se inmovilizaron en el chip sensor

GLC (Bio-Rad) mediante acoplamiento con aminas. La solución de PD-1 humana fluyó sobre los canales inmovilizados con anticuerpos y fue capturada por los anticuerpos de referencia. A continuación, el chip se giró 90° y se lavó con tampón de funcionamiento hasta que la línea de base se estabilizó. Los anticuerpos seleccionados se hicieron fluir sobre el chip sensor.

[0172] 3.4.2 El epítipo de unión de los anticuerpos PD-1 se comparó con el anticuerpo de referencia A y B mediante FACS. Las células CHO que expresan PD-1 humana en la superficie celular se incubaron con el anticuerpo de referencia A o B a una concentración de 10 µg/ml durante 1 hora. Se lavaron las células y se añadieron los anticuerpos PD-1 de la divulgación y se incubaron durante 1 hora. Se añadió el segundo anticuerpo anti-rata IgG-FITC y se incubó durante 1 hora a 4 °C. A continuación, las células se lavaron una vez y se resuspendieron en 1XPBS/1%BSA, y se analizaron por citometría de flujo (BD).

[0173] Los resultados del ensayo SPR y FACS para la prueba de clasificación mostraron que el epítipo en PD-1 humana unido por los anticuerpos PD-1 totalmente humanos (es decir, hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.139.15, y hAb 1.153.7) era diferente de los anticuerpos PD-1 existentes (es decir, anticuerpo de referencia A y B). Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

3.5 Función in vitro de los anticuerpos PD-1 comprobada mediante ensayos celulares:

[0174] 3.5.1 Efectos de los anticuerpos PD-1 humanos sobre la proliferación de células T. Se utilizó una respuesta alogénica para probar los efectos de los anticuerpos PD-1 en la proliferación de linfocitos T. La MLR primaria estimulada por célula dendrítica (DC) se realizó en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con fondo en U en 200 µl de RPMI 1640 con un 10% de FCS y antibióticos. Las DC se mezclaron con 1×10^5 células T CD4⁺ alogénicas totales en una relación entre 1:10 y 1:100 de DC:células T. También se realizaron cultivos en presencia o ausencia de mAbs neutralizantes: anticuerpos PD-1 humanos y anticuerpos de referencia A y B y se utilizaron a 10 µg /ml. Los ensayos se incubaron durante 5 días, y durante las últimas 16 h se añadió [³H]timidina a 1 uCi/pocillo. la incorporación de [³H]timidina se midió mediante recuento por centelleo, y las respuestas proliferativas se expresaron como la media de incorporación de [³H]timidina (recuentos por minuto) de pocillos triplicados. Los recuentos debidos únicamente a los DC se realizaron de forma rutinaria en <1000 cpm. Los resultados mostrados son ejemplos representativos de un mínimo de cinco experimentos realizados.

[0175] Las células dendríticas (DC) humanas y las células T CD4⁺ y CD8⁺ y totales utilizadas en la alo-MLR anterior se generaron a partir de PBMC según los siguientes procedimientos: Los monocitos humanos se purificaron a partir de PBMC mediante selección negativa utilizando el kit de cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos según las instrucciones del fabricante (StemCell Meylan). Brevemente, se aislaron PBMC de sangre de donantes sanos utilizando un gradiente Ficoll-Paque. Las células se lavaron dos veces con PBS, después se resuspendieron a 1×10^8 células/ml en tampón de aislamiento y se incubaron con la mezcla de Ab de enriquecimiento de monocitos a 4°C durante 30 min. Las células se lavaron y posteriormente se incubaron con coloide magnético a 4°C durante 30 min. Los monocitos no marcados pasaron a través de la columna MACS y se recogieron. Para generar iDC, se cultivaron monocitos en medio RPMI 1640 con un 10% de FCS y antibióticos con GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ; 800 U/ml) e IL-4 (PeproTech; 500 U/ml) a una concentración de 2×10^5 células/ml. La mitad del medio se sustituyó cada dos días con medio que contenía GM-CSF e IL-4. Las DC maduras se generaron estimulando las iDC con LPS (026: B6; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 1 µg/ml) el día 5 durante 24 h adicionales. Las células T CD4⁺, T CD8⁺ y T totales se purificaron mediante selección negativa incubando PBMC con una mezcla de enriquecimiento de células T CD4⁺, T CD8⁺ y T totales humanas y coloide magnético siguiendo las instrucciones del fabricante (Stemsep).

[0176] Se estimularon células T CD4⁺ humanas con DC alogénicas en presencia o ausencia de los anticuerpos hAb PD-1 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.139.15 y hAb 1.153.7. La proliferación de células T CD4⁺ se evaluó mediante la incorporación de [³H]timidina. La Figura 10 mostraba que los hAb 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.139.15 y hAb 1.153.7 aumentaban la proliferación de células T en función de la concentración. Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

[0177] 3.5.2 Efectos de los anticuerpos PD-1 humanos sobre la secreción de la citocina IFN γ in vitro: para evaluar directamente el efecto del bloqueo de los anticuerpos PD-1 humanos sobre la producción de la citocina IFN γ , realizamos experimentos sobre la producción de IFN γ en alo-MLR. Brevemente, las células T CD4⁺ humanas se purificaron a partir de PBMC mediante selección negativa con el kit de cóctel de enriquecimiento de células T CD4⁺ siguiendo las instrucciones del fabricante. Las DC inmaduras se generaron a partir de monocitos mediante cultivo en GM-CSF e IL-4 durante 5 días y las DC maduras se diferenciaron mediante estimulación con LPS a 1 µg/ml durante una noche. Las células T CD4⁺ se mezclaron con iDC/mDC en una relación entre 10:1 y 100:1 de T:DC. Los cultivos se realizaron en presencia o ausencia de anticuerpos PD-1 humanos y anticuerpos de referencia. Transcurridos 5 días, se recogieron los sobrenadantes de cada cultivo para medir la citocina IFN γ . El nivel de IFN γ en los sobrenadantes se midió mediante un ensayo ELISA. Brevemente, recubre las placas Maxisorp con mAb anti IFN-gamma humano diluido en tampón de recubrimiento (0,75 µg/ml; es decir, una dilución 1/1360), 50 µl/pocillo (es decir, para una placa completa de 96 pocillos, añada 3,7 µl de anticuerpo a 5 ml de tampón de recubrimiento) e incube durante la noche a 4 °C. Bloquear la capacidad de unión a proteínas sobrante añadiendo 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo durante 2 horas. Preparar diluciones de IFN-gamma recombinante para que actúen como estándares, diluciones dobles de 8000 pg/ml hasta 125 pg/ml, diluidas en medio completo, más medio completo solo. Lavar las placas y añadir los estándares y sobrenadantes de prueba

(100µl/pocillo), incubar durante 2-4 horas. Se añadió el mAb anti-IFN-gamma biotinilado (1/1333) en tampón de bloqueo, seguido de la adición de peroxidasa extra-avidina. La reacción se desarrolló añadiendo sustrato TMB y se detuvo con HCl 2M. Medir la absorbancia a 450 nm.

[0178] La Figura 9 muestra que las Células T CD4⁺ humanas fueron estimuladas con DC alogénicas en presencia o ausencia de los anticuerpos hAb PD-1 1.7.3, hAb 1.49.9, hAb 1.103.11, hAb 1.139.15 y hAb 1.153.7. El nivel de IFN γ se midió mediante ELISA. El resultado mostró que los anticuerpos PD-1 totalmente humanos aumentaron la secreción de IFN γ de forma dosificada. Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

[0179] 3.5.3 Efectos de los anticuerpos PD-1 humanos sobre la producción de interleucina 2(IL-2) in vitro: Las células T CD4⁺ se mezclaron con iDC/mDc en una relación entre 10:1 y 100:1 de T:DC. Los cultivos se realizaron en presencia o ausencia de anticuerpos PD-1 humanos y anticuerpos de referencia. Transcurridos 5 días, se recogieron los sobrenadantes de cada cultivo para medir las citocinas. El nivel de IL-2 en los sobrenadantes se midió mediante un ensayo ELISA.

[0180] La Figura 8 muestra que Células T CD4⁺ humanas fueron estimuladas con DC alogénicas en presencia o ausencia de anticuerpos plomo o Ab de control. El nivel de IL-2 se midió mediante ELISA. Los resultados mostraron que los anticuerpos contra PD-1 aumentaban la secreción de IL-2 de forma dependiente de la dosis. Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

[0181] 3.5.4 Efecto de los anticuerpos PD-1 humanos sobre la proliferación celular y la producción de citoquinas por la respuesta inmunitaria autóloga específica de antígeno: en este ensayo, las células T y las DC procedían de un mismo donante. Brevemente, las células T CD4⁺ se purificaron a partir de PBMC y se cultivaron en presencia del péptido pp65 del CMV y una dosis baja de IL2 (20U/ml), mientras que las DC se generaron cultivando monocitos a partir de PBMC del mismo donante en GM-CSF e IL4. Después de 5 días, las células T CD4⁺ tratadas con el péptido pp65 del CMV se co-cultivaron con DC pulsadas con el péptido pp65 en ausencia o presencia de anticuerpos PD-1 humanos y anticuerpos de referencia (como control). El día 5, se tomaron 100 µl de sobrenadantes de cada uno de los cultivos para medir las citocinas IFN γ e IL-2. El nivel de producción de IFN γ e IL-2 se detectó mediante un ensayo ELISA. La proliferación de células T específicas a DCs impulsadas por el péptido CMVpp65 se evaluó mediante la incorporación de [³H]timidina.

[0182] Como se muestra en la Figura 11, los anticuerpos PD-1 mejoraron la proliferación de células T CMV⁺-CD4⁺ dependiente de la concentración, estimuladas con DC autólogas cargadas con el péptido pp65 del CMV. Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

[0183] 3.5.5 Efecto de los anticuerpos PD-1 humanos sobre la función supresora de las células T reguladoras (Tregs): Las Tregs, una subpoblación de células T, son un modulador inmunitario clave y desempeñan funciones fundamentales en el mantenimiento de la autotolerancia. Las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ están relacionadas con los tumores, ya que se ha observado un aumento del número de Tregs en pacientes con múltiples tipos de cáncer, lo que se asocia a un peor pronóstico. Para evaluar directamente el efecto de los anticuerpos PD-1 humanos sobre la respuesta inmunosupresora, realizamos experimentos con Tregs. Las células T CD4⁺CD25⁺ y CD4⁺CD25⁻ se separaron utilizando microesferas específicas anti-CD25 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) y selección positiva o negativa, respectivamente. Inicialmente, las células T CD4⁺ se purificaron mediante selección negativa incubando PBMC con mezcla de enriquecimiento de células T CD4⁺ humanas y coloide magnético según las instrucciones del fabricante (Stemsep). A continuación, las células T CD4⁺ se resuspendieron en tampón MACS, se incubaron con microesferas CD25⁺ en hielo durante 30 minutos, se lavaron y se cargaron en la columna. Las células T CD4⁺CD25⁻, que no se unieron a la columna, se recogieron del flujo y se lavaron antes de su uso. Las células CD4⁺CD25⁺ se extrajeron posteriormente de la columna y se lavaron antes de su uso. Las Tregs se cultivaron con células T CD4⁺CD25⁻ y DC (relación Treg:Teff 1:1) en presencia o ausencia de anticuerpos PD-1 humanos a una concentración de 10µg/ml. Como control negativo se utilizó ningún anticuerpo o el anticuerpo isotipo. Los sobrenadantes de los cultivos se tomaron el día 5 para la detección de citocinas mediante ELISA y la proliferación celular se midió añadiendo [³H]timidina a una concentración de 1uCi/pocillo y se incubó durante 18 horas más. la incorporación de [³H]timidina se midió mediante recuento por centelleo. Como se muestra en la Figura 12, los anticuerpos PD-1 anulaban la función supresora de las Treg y restauraron la proliferación de células T respondedoras y la secreción de IFN γ . Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

[0184] 3.6 Ensayo ADCC/CDC: para minimizar la toxicidad no deseada en células PD-1⁺ sanas, se confirmó que los anticuerpos anti-PD-1 totalmente humanos seleccionados no tenían función ADCC y CDC.

[0185] 3.6.1 ADCC: Las células T activadas que expresaban altos niveles de PD-1 en la superficie celular se utilizaron como células diana y se preincubaron con varias concentraciones de anticuerpos totalmente humanos en placas de 96 pocillos durante 30 min. A continuación, se añadieron PBMC activadas con IL-2 (utilizadas como fuente de células natural killer (NK), es decir, las células efectoras) en una proporción efector/diana de 50:1. Las placas se incubaron durante 6 horas a 37°C en un incubador con un 5% CO₂. La lisis de las células diana se determinó mediante un kit de detección de citotoxicidad (Roche). La densidad óptica se midió con el lector de placas SpectraMax M5e de Molecular Devices. Los resultados mostraron que los anticuerpos totalmente humanos probados contra PD-1 no mediaron ADCC (Figura 13). Se

espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

[0186] 3.6.2 CDC: células diana (célula T activada), complemento de suero humano diluido (Quidel-A112) y varias concentraciones de anticuerpos PD-1 totalmente humanos se mezclaron en una placa de 96 pocillos. La placa se incubó durante 4 h a 37°C en un incubador con un 5% CO₂. La lisis de las células diana se determinó mediante CellTiter glo (Promega-G7573). Como control positivo se utilizaron Rituxan (Roche) y la línea celular de linfoma B humano Raji (CD20 positiva). Los datos mostraron que los anticuerpos PD-1 no mediaron la CDC (Figura 14). Se espera que el hAb 1.103.11-v2 en el mismo experimento tenga un resultado comparable al del hAb 1.103.11.

EJEMPLO 4: Cartografía epitópica del anticuerpo totalmente humano

[0187] Para determinar la diferencia de epítipo entre el presente anticuerpo hAb 1.103.11 proporcionado en el presente documento y Keytruda, un anticuerpo hPD-1 conocido, se realizaron experimentos de barrido de alanina en hPD-1 y la evaluación del efecto a la unión del anticuerpo utilizando hAb 1.103.11, Keytruda y 11.148.10 (un anticuerpo hPD-1 de control que se une a un epítipo que no se solapa con el de hAb 1.103.11 o el de Keytruda).

[0188] Los residuos de alanina en hPD-1 se mutaron a codones de glicina, y todos los demás residuos se mutaron a codones de alanina. Para cada residuo del dominio extracelular (ECD) de hPD-1, se realizaron sustituciones puntuales de aminoácidos mediante dos pasos secuenciales de PCR. Se utilizó como molde un plásmido pcDNA3.3-hPD-1_ECD.His que codifica la ECD de la PD-1 humana y una etiqueta His C-terminal, y se empleó un conjunto de cebadores mutagénicos para la PCR de primer paso utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QuikChange lightning (Agilent technologies, Palo Alto, CA). La endonucleasa *Dpn* I se utilizó para digerir la plantilla parental tras la reacción de síntesis de la cadena mutante. En el segundo paso de la PCR, se amplificó y expresó transitoriamente en células HEK293F (Life Technologies, Gaithersburg, MD) un casete de expresión de ADN lineal compuesto por un promotor CMV, un dominio extracelular (ECD) de PD-1, una etiqueta His y una poliadenilación de timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple.

[0189] Los anticuerpos monoclonales hAb 1.103.11, keytruda y hAb 11.148.10 se recubrieron en placas para el ensayo de unión ELISA. Tras interaccionar con el sobrenadante que contiene el mutante PD-1 cuantificado, se añadió anticuerpo anti-His conjugado con HRP (Rockland, Cat#200-303-382) como anticuerpo de detección. La absorbancia se normalizó según la media de los mutantes de control. Tras fijar un límite adicional al cambio de pliegue de unión (<0,55), se identificaron los residuos epitópicos finalmente determinados.

[0190] En la Tabla 2 se mostraron los 30 mutantes hPD-1 sustituidos puntualmente que redujeron significativamente la unión de anticuerpos. La comprobación de las posiciones de todos estos residuos en las estructuras cristalinas de hPD-1 (código PDB 3RRQ y 4ZQK) reveló que algunos aminoácidos (por ejemplo, Val144, Leu142, Val110, Met108, Cys123, etc.) estaban totalmente enterrados en la proteína, y era improbable que contactaran directamente con ningún anticuerpo. Lo más probable es que las reducciones de la unión observadas se debieran a la inestabilidad o incluso al colapso de la estructura de hPD-1 tras las sustituciones de alanina. Para evitar interpretar erróneamente estos datos como áreas pequeñas de epítopos, aprovechamos un anticuerpo de control hAb 11.148.10, que se une a una localización bastante diferente en el antígeno, pero que se espera que responda al colapso de la estructura de hPD-1 si realmente ocurre. Los mutantes que afectan a ambos anticuerpos se trataron como falsas áreas pequeñas y se eliminaron de la lista. Tras establecer un límite adicional al cambio de pliegue de unión (<0,55), los residuos epitópicos finalmente determinados se enumeraron en la Tabla 3. Son 9 posiciones a hAb 1.103.11 y 5 posiciones a Keytruda, y 10 residuos al anticuerpo de control hAb 11.148.10.

Tabla 2. Efecto de las mutaciones puntuales de PD-1 sobre la unión de anticuerpo

#Res. PD-1	1.103.11 hAb		#Res. PD-1	Keytruda		#Res. PD-1	11.148.10 hAb	
	multiplicación ^a	SD		multiplicación ^a	SD		multiplicación ^a	SD
V 144	0.22	0.00	P 89	0.18	0.02	V 144	0.03	0.01
A 129	0.22	0.00	D 85	0.38	0.01	F 56	0.06	0.02
D 85	0.24	0.01	V 144	0.40	0.01	L 142	0.09	0.00
P 83	0.30	0.01	R 94	0.46	0.04	D 48	0.21	0.01

(Continuación)

	L 128	0.32	0.01	F 106	0.47	0.05	R 143	0.26	0.01
5	V 64	0.32	0.01	K 78	0.48	0.00	C 123	0.27	0.01
	Q 133	0.37	0.03	P 83	0.50	0.01	F 106	0.29	0.04
	P 130	0.41	0.00	D 92	0.50	0.02	V 44	0.34	0.01
10	F 106	0.41	0.02	P 39	0.54	0.00	L 41	0.35	0.00
	K 131	0.43	0.01	A 81	0.57	0.01	A 50	0.35	0.02
	L 142	0.44	0.00	C 123	0.57	0.01	F 95	0.37	0.01
15	C 123	0.46	0.00	N 66	0.57	0.03	V 43	0.37	0.01
	A 132	0.53	0.01	L 142	0.59	0.01	V 110	0.41	0.01
	P 39	0.55	0.02	F 82	0.61	0.03	M 108	0.43	0.11
20	M 108	0.56	0.00	F 95	0.61	0.04	R 94	0.46	0.12
	F 52	0.59	0.00	F 52	0.63	0.01	C 93	0.48	0.03
25	K 135	0.62	0.01	M 108	0.64	0.06	R 86	0.49	0.01
	S 137	0.62	0.01	L 128	0.68	0.01	D 117	0.49	0.12
	F 95	0.63	0.02	I 126	0.72	0.01	A 113	0.51	0.01
30	I 126	0.64	0.01	A 113	0.72	0.01	T 45	0.51	0.03
	F 82	0.65	0.01	V 110	0.73	0.04	L 42	0.53	0.01
	I 134	0.69	0.01	G 47	0.73	0.01	A 40	0.54	0.00
35	R 94	0.70	0.01	D 117	0.73	0.07	P 39	0.55	0.00
	A 50	0.73	0.01	N 49	0.73	0.00	G 90	0.56	0.08
40	D 117	0.73	0.01	S 87	0.74	0.06	N 49	0.58	0.01
	A 113	0.73	0.02	L 42	0.76	0.01	S 137	0.58	0.02
	N 49	0.73	0.01	N 102	0.76	0.01	Y 68	0.58	0.03
45	L 65	0.75	0.01	W 67	0.81	0.01	W 67	0.60	0.03
	W 67	0.76	0.01	P 101	0.81	0.04	F 52	0.60	0.05
50	G 47	0.77	0.00	A 80	0.82	0.01	R 69	0.61	0.05

Negrita: aminoácidos superpuestos con el haB 11.148.10 de control para mantener la estructura que fueran excluidos de la lista de áreas pequeñas.

^a La multiplicación en la unión es con relación a la unión de varias sustituciones de alanina silenciosas.

Tabla 3. Identificación de epítomos potenciales

	PD-1 para hAb 1.103.11	local. residuo	PD-1 para Keytruda	local. residuo	PD-1 para hAb 11.148.10	local. residuo
5	V 64	C	K 78	C'	L 41	A'
	P 83	C'	P 83	C'	V 43	A'
10	D 85	C''	D 85	C''	V 44	A'
	L 128	FG	P 89	C''	T 45	A'
	A 129	FG	D 92	C''D	D 48	A'B
	P 130	FG			A 50	B
15	K 131	G			F 56	B
	A 132	G			R 86	C''
	Q 133	G			C 93	C''D
20	PD-1 para hAb 1.103.11	local. residuo	PD-1 para Keytruda	local. residuo	PD-1 para hAb 11.148.10	local. residuo
					R 143	G

Corte: multiplicación < 0.55

25 * C, C', C'', F, G, A' representan las cadenas peptídicas en la estructura cristalina de la hPD-1 como se muestra en la Figura 17. La cadena C'' observada en mPD-1 no existe en la estructura de hPD-1. Esta lámina β se sustituye por un bucle sin estructura en hPD-1. Todavía usamos C'' para marcar esta región, sólo con el propósito de facilitar la comparación con mPD-1.

30 **[0191]** La comparación de los residuos del epítipo de hAb 1.103.11 y Keytruda en la Tabla 3 sólo reveló dos residuos de áreas pequeñas superpuestos. El resto parecía bastante diverso, lo que indicaba que dos anticuerpos podrían haber adoptado mecanismos muy diferentes en cuanto a la unión de hPD-1 y el bloqueo de hPD-L1. La lectura de las identificaciones de los residuos en la Tabla 3 no es sencilla para interpretar los mecanismos. Por lo tanto, todos los datos de la Tabla 3, así como el sitio de unión de hPD-L1, se mapearon en la estructura cristalina de hPD-1 para realizar una mejor visualización y comparación (Figura 17).

35 **[0192]** Como se muestra en la Figura 17, todos los residuos de área pequeña a cargo de la unión de hPD-L1 se reunieron en el medio de las cadenas C, F y G (Figura 17A). Dos anticuerpos investigados hAb 1.103.11 y Keytruda, aunque ambos son funcionales en la unión de hPD-1 y el bloqueo de hPD-L1, tienen epítomos obviamente diferentes (Figura 17B para hAb 1.103.11, 17C para Keytruda). Al epítipo de Keytruda contribuyeron principalmente los residuos del bucle C'D (correspondiente a la cadena C'' de mPD-1), que no se cruzaban en absoluto con el sitio de unión de PD-L1. Esto sugería que la función de bloqueo de hPD-L1 de Keytruda dependía más de sus efectos de impedimento estérico proporcionados por el tamaño del anticuerpo. Por el contrario, el epítipo de nuestro anticuerpo principal hAb 1.103.11 estaba compuesto por áreas pequeñas distribuidas en múltiples localizaciones, y tienen solapamiento directo con el sitio de unión de hPD-L1 (Figura 17A, 17B). El presente hAb 1.103.11 bloqueó hPD-L1 al ser más competitivo que hPD-L1 en la reacción a su sitio de unión común. Por lo tanto, se espera que el hAb 1.103.11 sea más funcional en los desarrollos posteriores.

50 **[0193]** El anticuerpo hAb 11.148.10, sin embargo, se une a una localización completamente diferente (Figura 17D) de dos anticuerpos funcionales, lo que se confirmó como un buen anticuerpo de control para monitorizar la función de hPD-1 en la realización de sustituciones de alanina.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-PD-1 aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
 - a) una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 53 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID N.º: 55; o
 - b) una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 53 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID N.º: 67.
2. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID N.º: 53 y una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID N.º: 67.
3. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2, que no media ADCC o CDC o ambas.
4. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.
5. El anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 4, que es producido por una rata transgénica.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es un diacuerpo, un scFv, un dímero de scFv, un BsFv, un dsFv, un (dsFv)₂, un dsFv-dsFv', un fragmento de Fv, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, o un diacuerpo ds.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una región constante de inmunoglobulina; y/o que comprende además un conjugado.
8. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un vector que comprende el polinucleótido aislado de la reivindicación 8.
10. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 9.
11. Un método para expresar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 en la condición en la que se expresa el polinucleótido de la reivindicación 8.
12. Un kit que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.
14. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en el tratamiento de un cáncer o infección viral crónica en un sujeto que se beneficiaría de la regulación al alza de la respuesta inmunitaria, opcionalmente en el que el sujeto tiene expresión de regulación positiva de PD-L1.

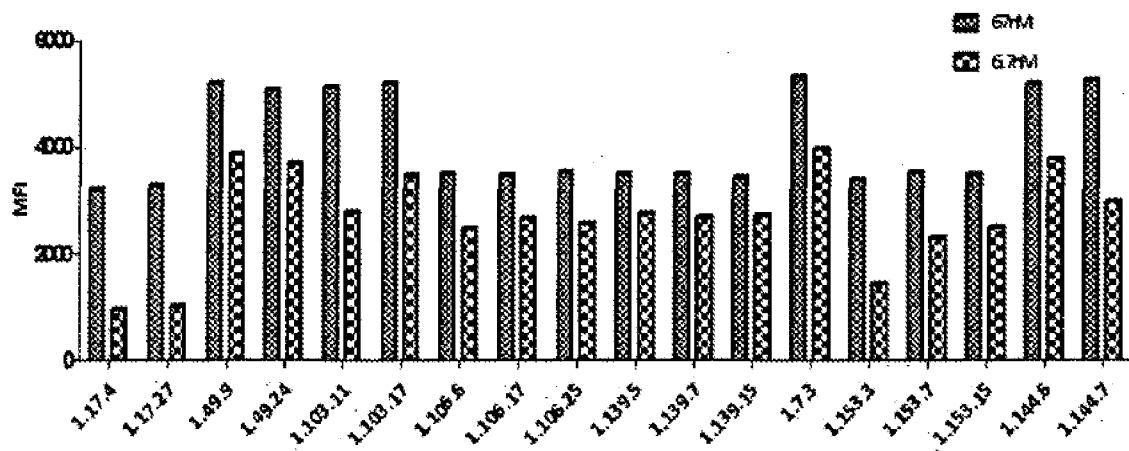


Figura 1

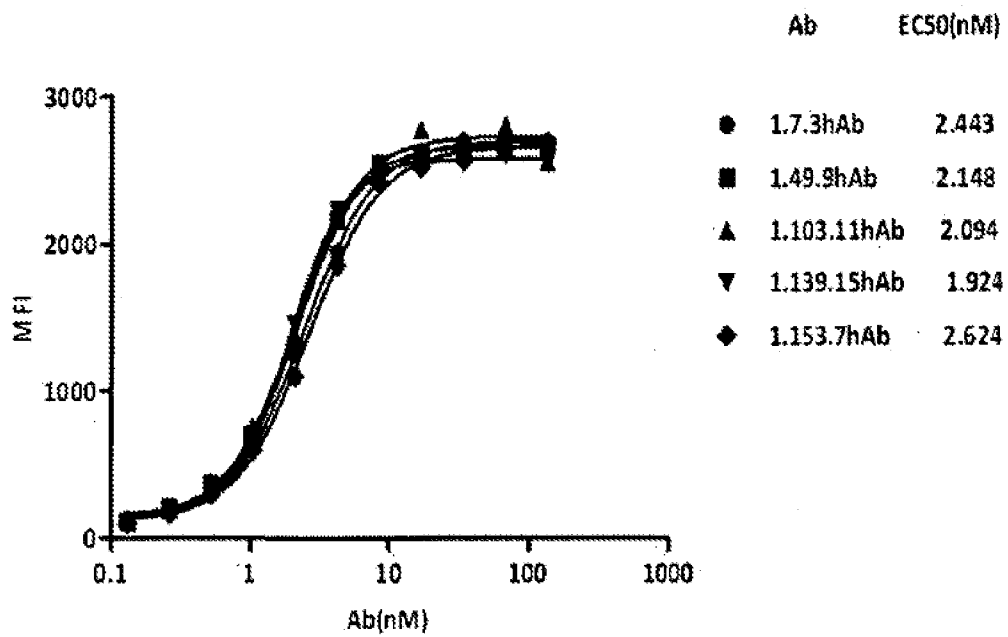


Figura 2

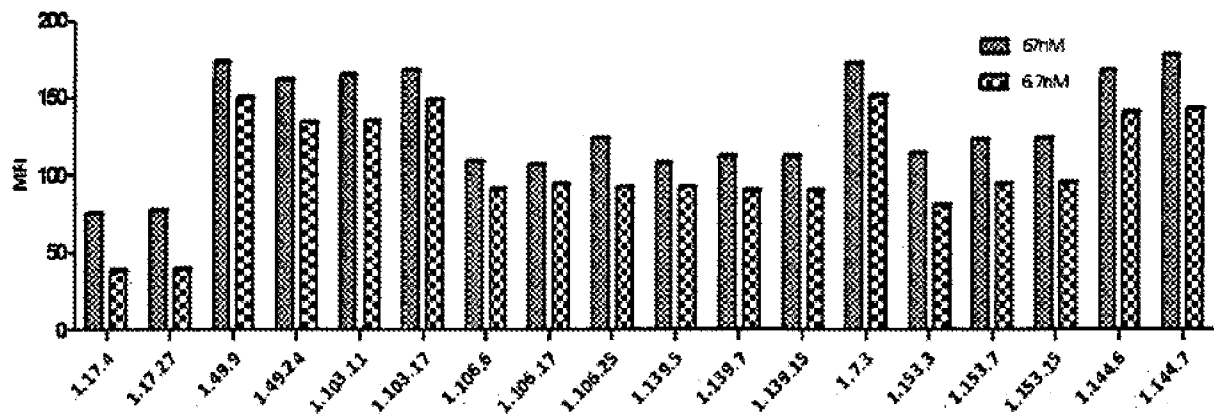


Figura 3

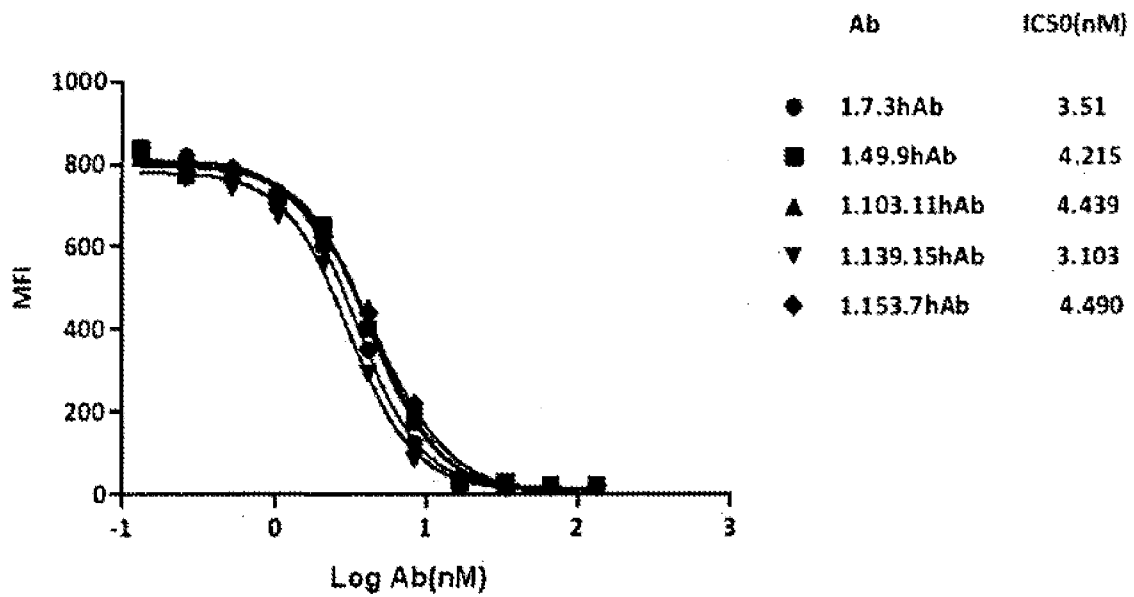


Figura 4

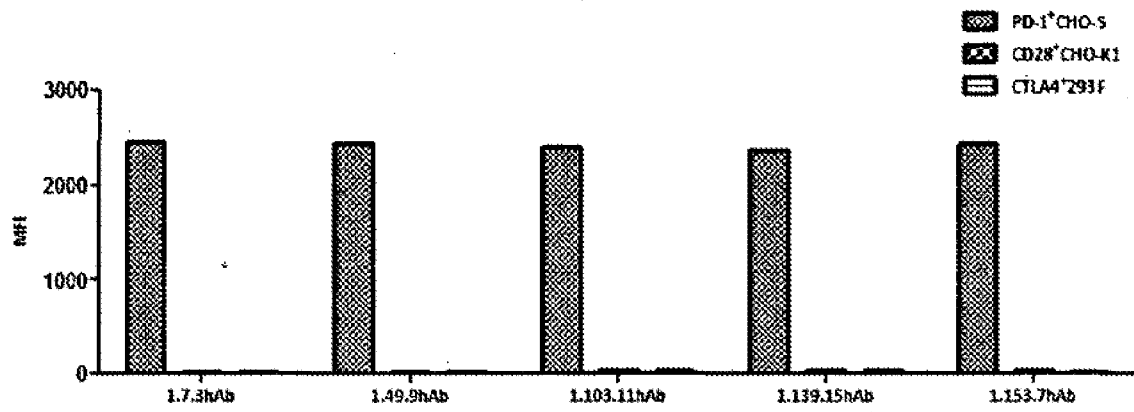


Figura 5

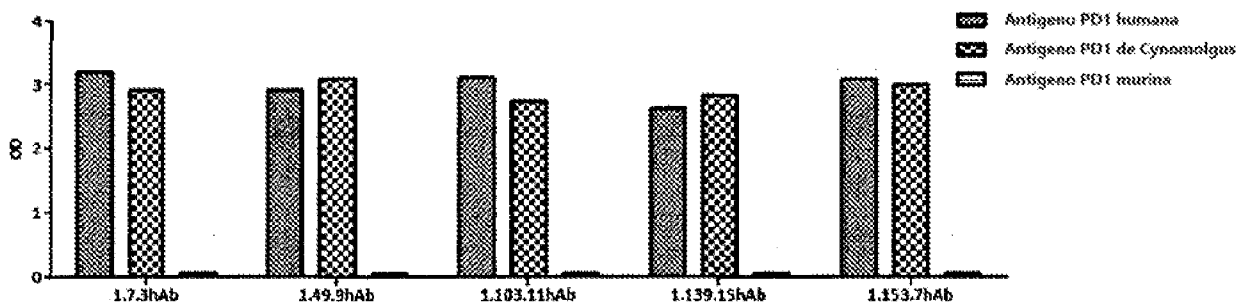


Figura 6

Analito	Ligando	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	χ^2 (RU)
WBP305.hpro1.ECD.his	1.7.3 hAb	1.70E+06	2.98E-04	1.76E-10	61.9	2.63
	1.49.9 hAb	1.08E+06	1.16E-03	1.07E-09	44.15	2.43
	1.103.11 hAb (305-2)	1.12E+06	1.96E-04	1.75E-10	54.14	2.58
	1.139.15 hAb	1.05E+06	3.89E-03	3.71E-09	65.02	2.16
	1.153.7 hAb (305-1)	2.62E+05	7.33E-04	2.79E-09	53.54	2.05

Figura 7

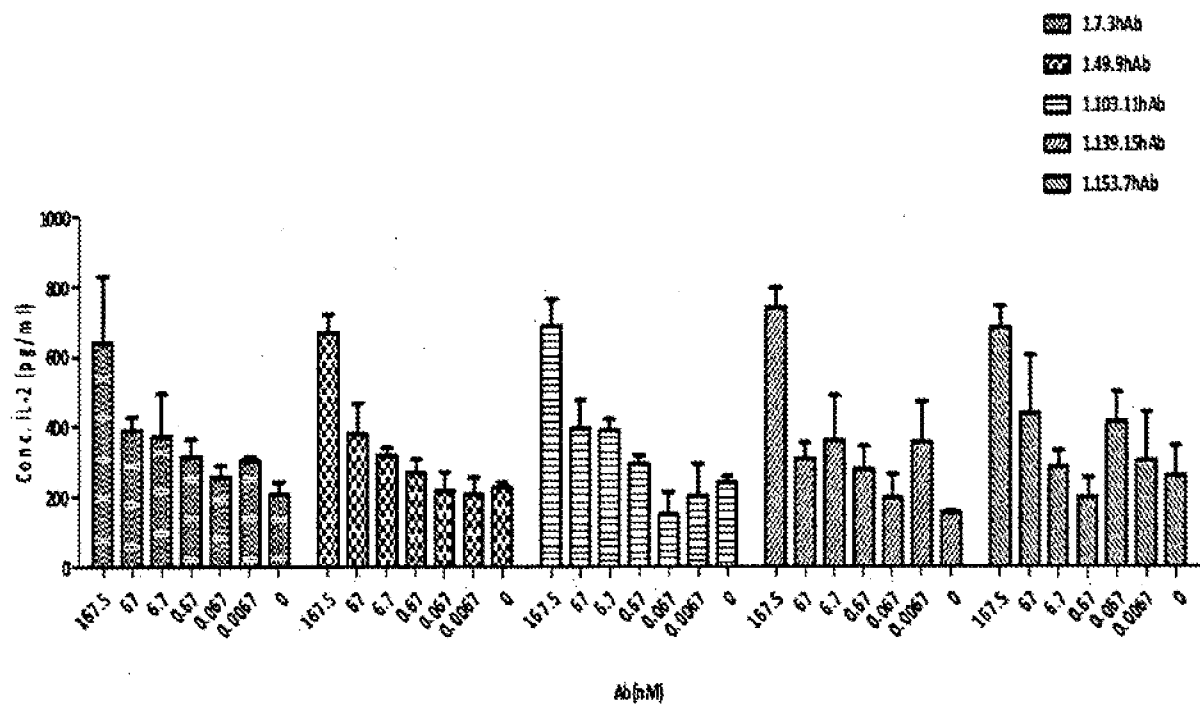


Figura 8

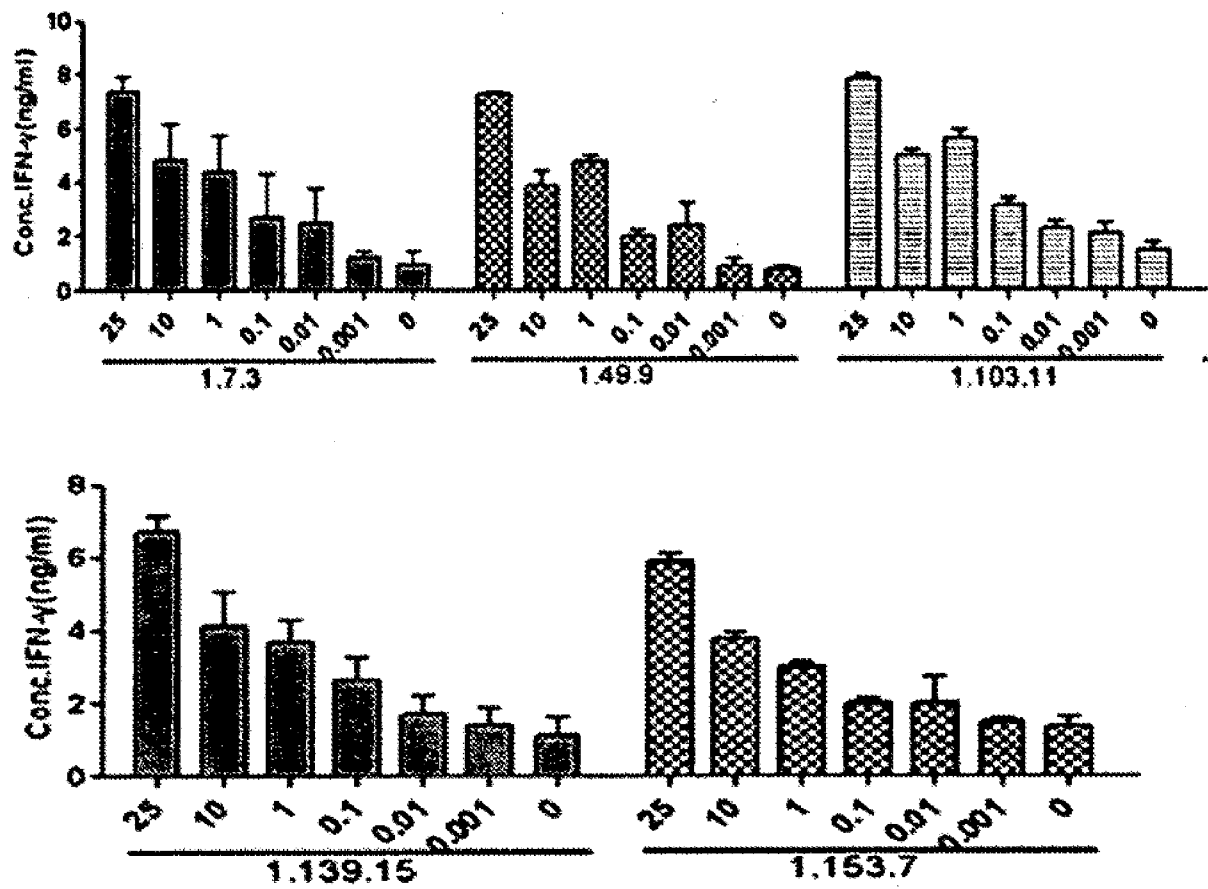


Figura 9

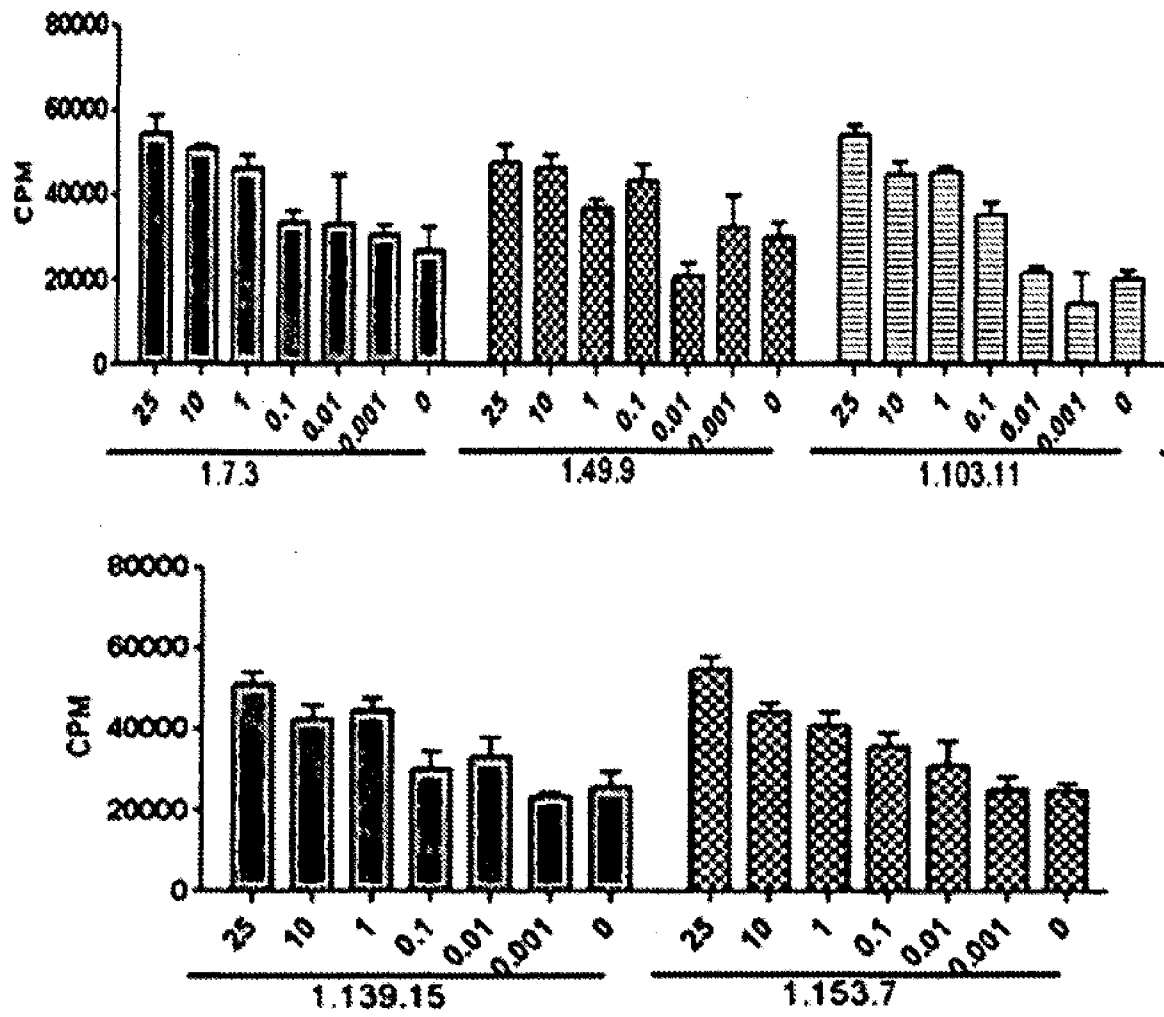


Figura 10

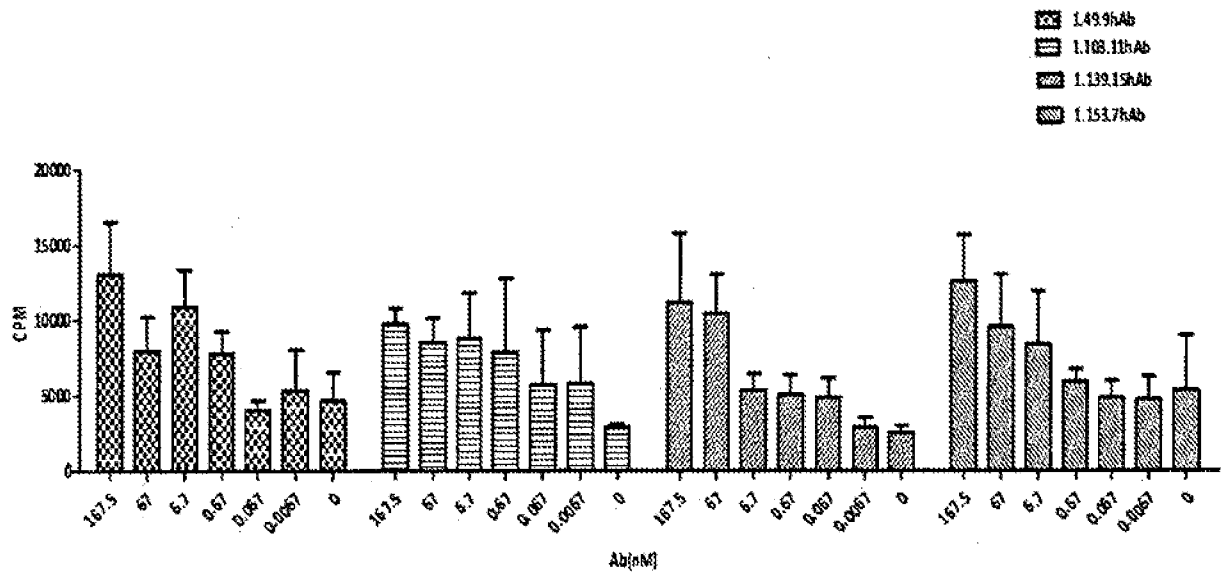


Figura 11

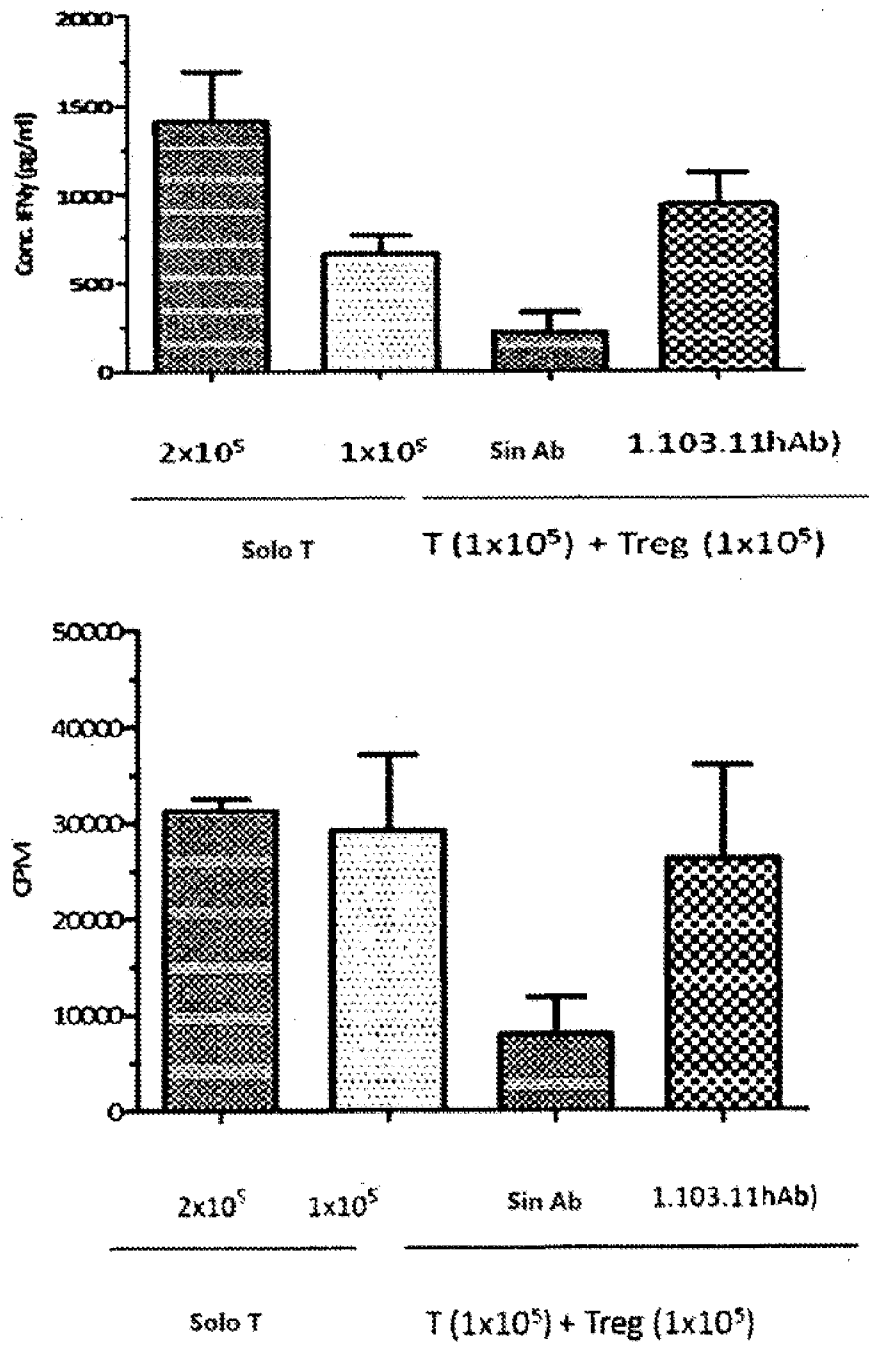


Figura 12

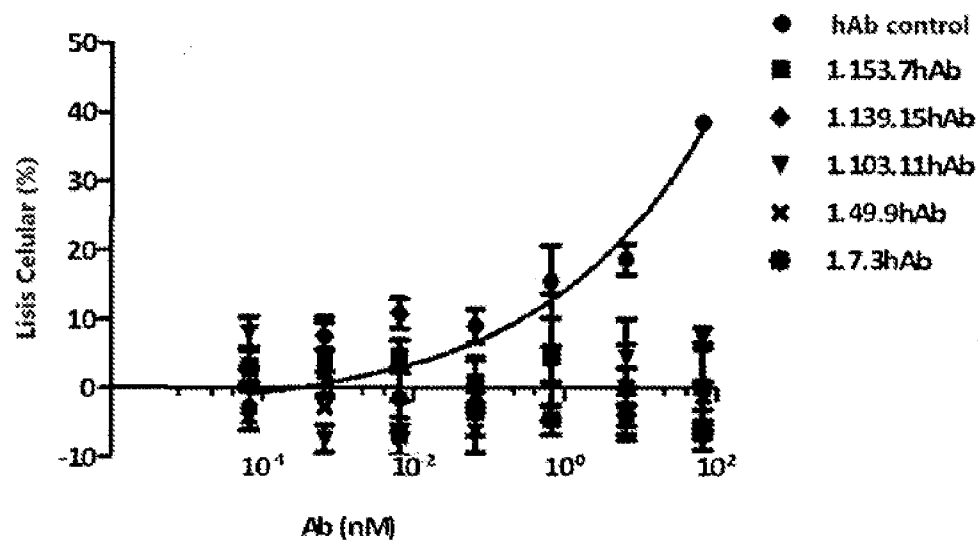


Figura 13

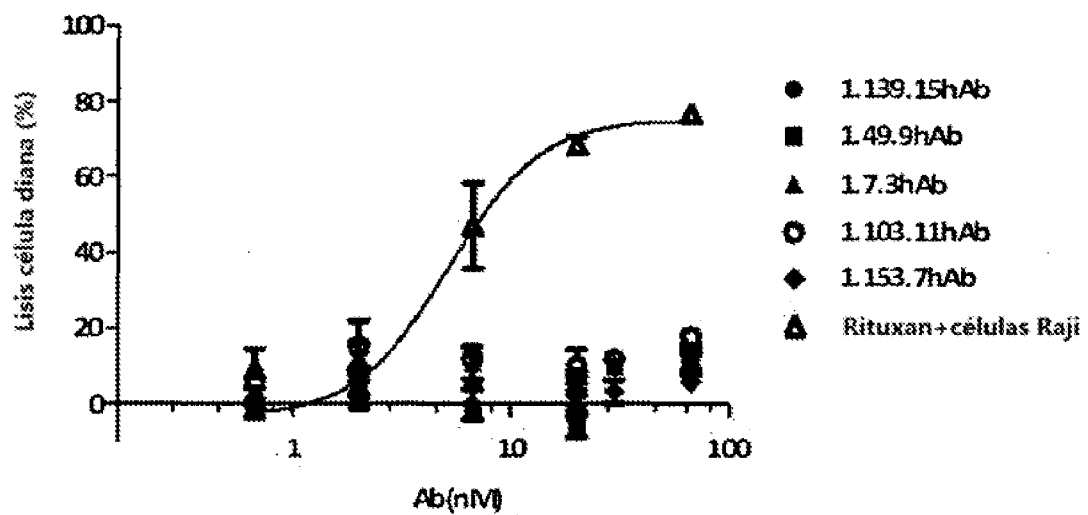


Figura 14

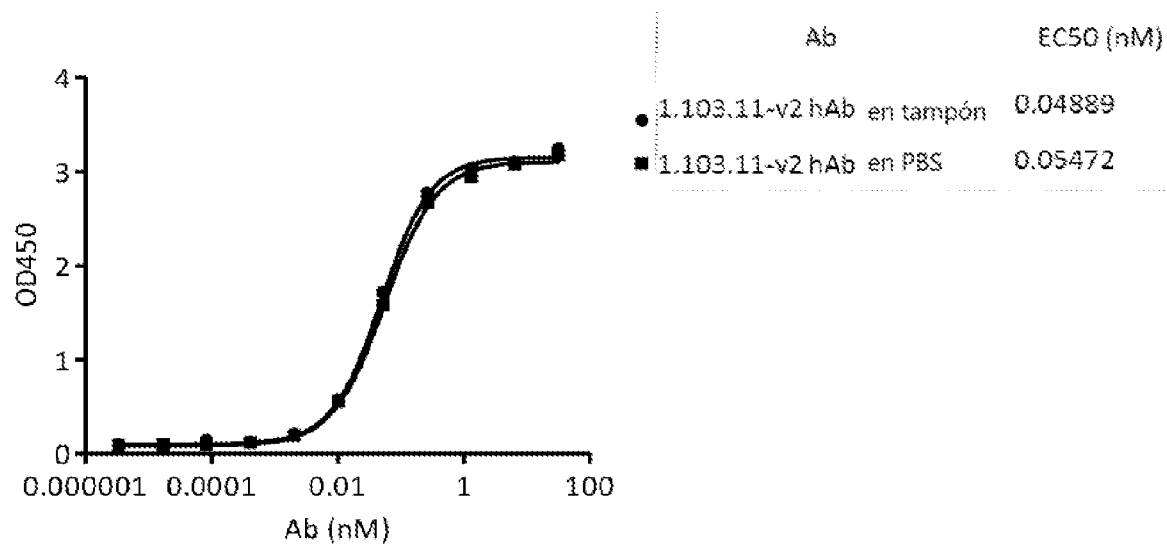


Figura 15

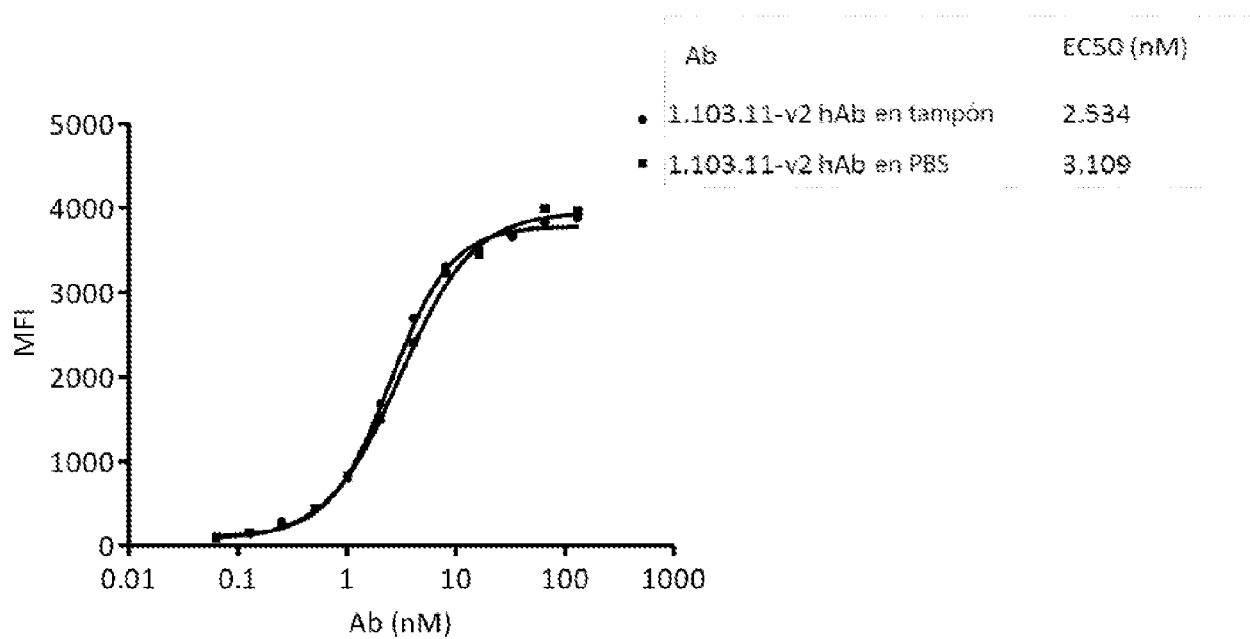


Figura 16

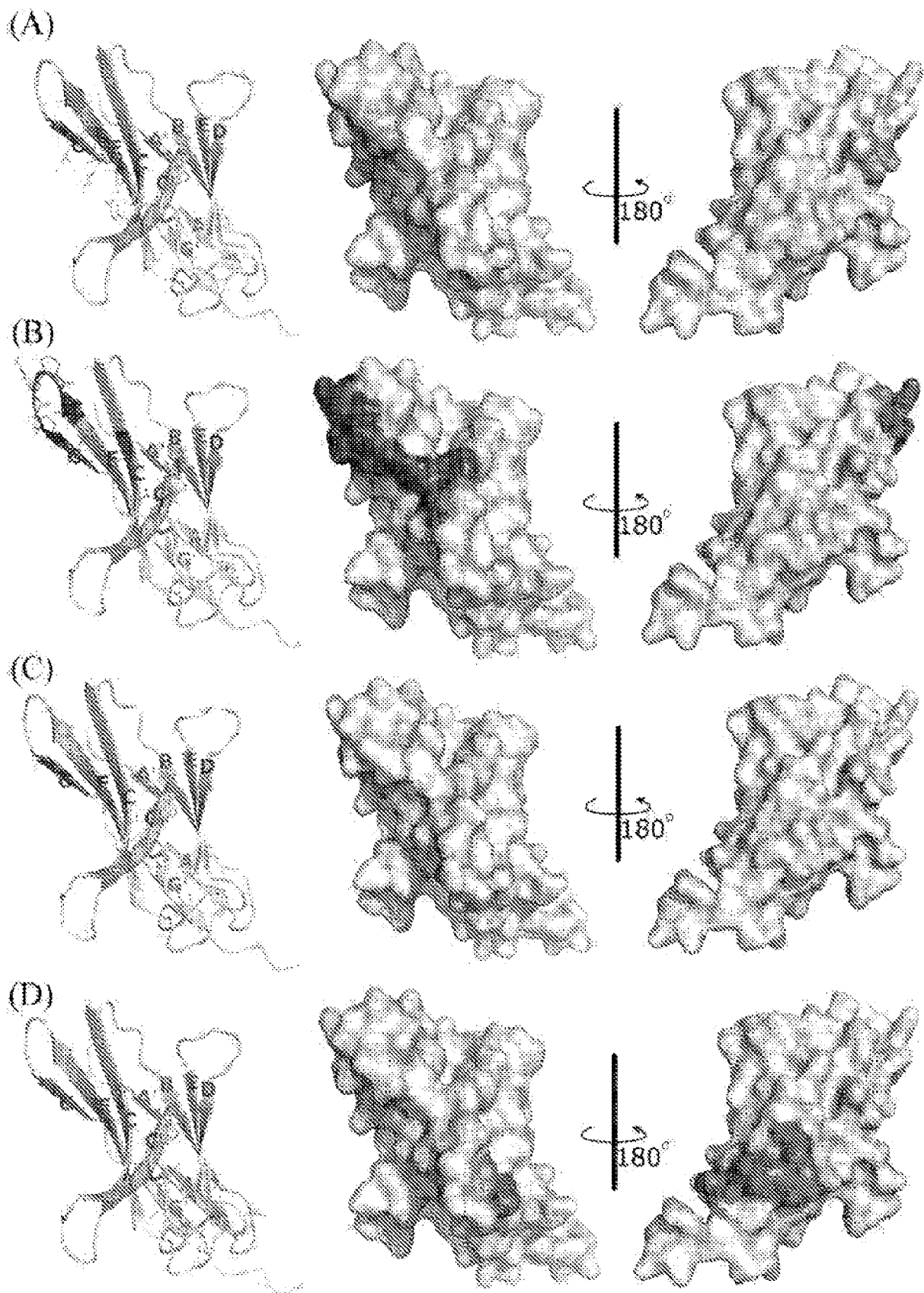


Figura 17