

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 034**

51 Int. Cl.:

A61P 31/04	(2006.01) A61P 33/12	(2006.01)
A61P 31/10	(2006.01) A61K 47/68	(2007.01)
A61P 31/12	(2006.01)	
A61P 31/16	(2006.01)	
A61P 33/00	(2006.01)	
A61P 31/06	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61P 35/02	(2006.01)	
C07K 16/28	(2006.01)	
A61P 33/06	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2015** **PCT/US2015/043723**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016** **WO16022630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2015** **E 15829791 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** **EP 3177649**

54 Título: **Anticuerpos anti-PD-L1**

30 Prioridad:

05.08.2014 WO PCT/CN2014/083715

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

13.11.2024

73 Titular/es:

**APOLLOMICS INC. (100.0%)
989 E Hillsdale Blvd, Suite 220
Foster City, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

**SUN, ZIYONG;
ZHA, JIPING y
QIU, JUNZHUAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 987 034 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-PD-L1

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a PD-L1, y a métodos de uso de dichos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno.

10 Antecedentes

El ligando 1 del receptor de muerte programada (PD-L1) es un ligando del receptor 1 de muerte programada (PD-1). PD-1 se expresa principalmente en linfocitos y tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-L2 no es tan común como PD-L1. PD-L1 también se conoce como el grupo de diferenciación 274 (CD274) u homólogo 1 de B7 (B7-H1) y es una proteína transmembranaria de tipo 1 de 40 kDa que está codificada por el gen CD274. Tanto PD-L1 como PD-1 pertenecen a la superfamilia de inmunoglobulina y consisten en dos dominio de Ig extracelulares, un dominio V aminoterminal y un dominio constante carboxiterminal. La superficie de contacto de unión a PD-L1 al receptor 1 de muerte programada (PD-1) y B7-1 (CD80) están en el dominio similar a IgV (Lin *et al.* (2008) PNAS 105:3011-3016). Aunque PD-L1 contiene una corta cola intracelular conservada (aproximadamente 30 aminoácidos), PD-1 contiene dos motivos de señalización citoplasmáticos basados en tirosina, un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) y un motivo de conmutación basado en tirosina inmunorreceptora (ITSM). Después de la estimulación de linfocitos T, PD-1 recluta la tirosina fosfatasa SHP-2 al motivo ITSM dentro de su cola citoplasmática, lo que da lugar a la desfosforilación de moléculas efectoras tales como CD3 zeta, PKC teta y ZAP70 que están implicadas en la cascada de señalización de linfocitos T CD3 (Freeman *et al.* (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman, *et al.* (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter *et al.* (2002) Eur J Immunol 32:634-43).

PD-L1 no solamente está ampliamente distribuido en leucocitos y células no hematopoyéticas en tejidos linfáticos y no linfáticos, sino también en diversas células cancerosas. Los datos clínicos sugieren que la alta expresión tumoral de PD-L1 está asociada con agresividad aumentada del tumor y peor pronóstico. La formación del complejo de PD-1/PD-L1 transmite una señal inhibidora y regula negativamente las respuestas inmunitarias de linfocitos T; inhibe la activación de linfocitos T mediada por TCR, la producción de citocinas y la proliferación de linfocitos T (Fife *et al.* (2011) Nature Immunology 10:1185-1193); induce el agotamiento o la anergia entre linfocitos T específicos de antígenos afines (Hofmeyer *et al.* (2011) Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011:1-9); promueve la diferenciación de linfocitos Th1 en linfocitos T reguladores Foxp3+ (Armanath *et al.* (2011) Science TransMed 3:1-13; Francisco *et al.* (2009) J. Exp. Med. 206:3015-3029); e induce la apoptosis de linfocitos T efectores. La alteración del gen de PD-L1 da lugar a respuestas de linfocitos T reguladas por aumento y la generación de linfocitos T autorreactivos (Latchman *et al.* (2004) PNAS 101:10691-10696). El bloqueo por anticuerpos de PD-1 o PD-L1 da lugar a inmunidad antitumoral aumentada (Iwai *et al.* (2002) PNAS 99:12293-12297).

Por tanto, hay una función importante para la ruta de PD-1/PD-L1 en el control de las respuestas inmunitarias. La disfunción de PD-1/PD-L1 parece estar correlacionada con el inicio y desarrollo de enfermedades tales como cáncer e infección vírica. El análisis de animales con inactivación ha dado lugar a la comprensión de que PD-1/PD-L1 funciona principalmente en la inducción y regulación de la tolerancia periférica. Por tanto, el bloqueo terapéutico de la ruta de PD-1/PD-L1 sería de ayuda para superar la tolerancia inmunitaria y en el tratamiento de cáncer o infección, así como en el refuerzo de la inmunidad durante la vacunación (profiláctica o terapéutica). Hay una necesidad en la técnica de métodos mejorados para bloquear la ruta de PD-1/PD-L1. Los documentos WO 2013/181452 y WO 2014/066834 describen anticuerpos anti-PD-L1.

Sumario de la invención

La presente invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a PD-L1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.

En un aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 proporcionado en este documento es un anticuerpo humanizado que tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 42 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 44; en donde el anticuerpo anti-PD-L1 tiene una CE50 de unión a PD-L1 de aproximadamente 200 ng/ml o menos o aproximadamente 150 ng/ml o menos o aproximadamente 100 ng/ml o menos o aproximadamente 80 ng/ml o menos o aproximadamente 60 ng/ml o menos o aproximadamente 50 ng/ml o menos, medida por ELISA o FACS. En otro aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 proporcionado en este documento es un anticuerpo humanizado que tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 42 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 44; en donde el anticuerpo anti-PD-L1 tiene una CI50

de bloqueo de PDL1/PD-1 de aproximadamente 1200 ng/ml o menos, o aproximadamente 1000 ng/ml o menos, o aproximadamente 800 ng/ml o menos, o aproximadamente 600 ng/ml o menos, o aproximadamente 500 ng/ml o menos, o aproximadamente 400 ng/ml o menos, o aproximadamente 300 ng/ml o menos, o aproximadamente 200 ng/ml o menos, o aproximadamente 100 ng/ml o menos, o aproximadamente 60 ng/ml o menos, o aproximadamente 30 ng/ml o menos, o aproximadamente 25 ng/ml o menos, o aproximadamente 20 ng/ml o menos, o aproximadamente 10 ng/ml o menos, medida por ELISA o FACS. En otro aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 proporcionado en este documento es un anticuerpo humanizado que tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de acuerdo con SEQ ID NO: 42 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de acuerdo con SEQ ID NO: 44; en donde el anticuerpo anti-PD-L1 tiene una afinidad de unión kD por PD-L1 de aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 5 nM o menos, o aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos, o aproximadamente 0,5 nM o menos, o aproximadamente 0,1 nM o menos, o aproximadamente 0,05 nM o menos, medida por ensayo Biacore. En un aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 humanizado tiene una afinidad de unión kD por PD-L1 de aproximadamente 2 nM. En otra realización, el anticuerpo anti-PD-L1 humanizado tiene una afinidad de unión kD por PD-L1 de aproximadamente 1 nM. En otro aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 humanizado tiene una afinidad de unión kD por PD-L1 de aproximadamente 0,5 nM. En otro aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 humanizado tiene una afinidad de unión kD por PD-L1 de aproximadamente 0,1 nM.

En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos proporcionados en este documento se unen a PD-L1, alterando la interacción de PD-1/PD-L1 y provocando un aumento en la activación de linfocitos T. En un aspecto adicional, los anticuerpos y fragmentos de los mismos se unen a PD-L1 y provocan un aumento en la proliferación de linfocitos T y/o producción de citocinas. En un aspecto adicional más, los anticuerpos y fragmentos de los mismos se unen a PD-L1 y provocan un aumento de una o más citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-2, IFN γ , TNF, IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-17 y GM-CSF. En un aspecto, una respuesta inmunitaria puede modularse por los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos proporcionados en este documento, que puede medirse en una reacción de linfocitos mixtos (MLR). En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 proporcionados en este documento aumentan el nivel de producción de citocinas desde linfocitos en una MLR. En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-PD-L1 aumentan el nivel de producción de IL-2 y/o producción de IFN γ en una MLR. En un aspecto adicional más, los anticuerpos anti-PD-L1 aumentan el nivel de producción de IL-2 y producción de IFN γ en una MLR. En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 potencian las respuestas de linfocitos T de memoria. En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-PD-L1 potencian las respuestas de linfocitos T de memoria medidas por un aumento en la producción de IFN γ desde linfocitos T de memoria.

En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos proporcionados en este documento inhiben la función de linfocitos T reguladores. En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos inhiben la supresión de linfocitos T efectores por linfocitos T reguladores. En otro aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos restablecen las funciones efectoras de los linfocitos T en presencia de linfocitos T reguladores. En un aspecto adicional, los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos restablecen la capacidad de los linfocitos T efectores de proliferar y/o producir citocinas en presencia de linfocitos T reguladores. Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir los efectos supresores de los linfocitos T reguladores *in vitro* o en un sujeto que lo necesita.

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos y fragmentos de los mismos proporcionados en este documento. Los vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos aislados, y células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión, están también incluidos en la invención.

En una realización, la presente invención proporciona inmunoconjugados de anticuerpo anti-PD-L1. Por tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a PD-L1 y que se liga o conjuga a un agente terapéutico. Los agentes terapéuticos que pueden ligarse o conjugarse al anticuerpo anti-PD-L1 pueden incluir, aunque sin limitación, fármacos citotóxicos, isótopos radiactivos, inmunomoduladores o anticuerpos.

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos anti-PD-L1 o fragmentos de los mismos proporcionados en este documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la presente invención proporciona el anticuerpo aislado o fragmento del mismo de la invención para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de la invención. El cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma, leucemia, melanoma, glioma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer testicular, cáncer salival, cáncer tiroideo, cáncer tímico, cáncer epitelial, cáncer de cabeza o cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático o una combinación de los mismos.

En una realización, la presente invención proporciona el anticuerpo aislado o fragmento del mismo de la invención para su uso en un método de tratamiento de enfermedades infecciosas en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de la invención. La enfermedad infecciosa se selecciona del grupo que consiste en candidiasis, candidemia, aspergilosis, neumonía estreptocócica, afecciones estreptocócicas de la piel y orofaríngeas, septicemia gramnegativa, tuberculosis,

mononucleosis, gripe, enfermedad respiratoria provocada por el virus sincitial respiratorio, paludismo, esquistosomosis y tripanosomosis.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1a-d** es un conjunto de gráficos que muestran la unión de los anticuerpos de hibridoma murino anti-PD-L1 a PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medida por ELISA. La unión de los anticuerpos de hibridoma 8H3-mlgG (m8H3), 15F1-mlgG (m15F1), 5G9-mlgG (m5G9) y 4A8-mlgG (m4A8) se muestra en la **figura 1a**. La unión de los anticuerpos de hibridoma 5G11-mlgG (m5G11), 7B4-mlgG (m7B4), 4D1-mlgG (m4D1) y 8H4-mlgG (m8H4) se muestra en la **figura 1b**. La unión del anticuerpo de hibridoma 8C6-mlgG (m8C6) se muestra en la **figura 1c**. La unión del anticuerpo de hibridoma 13C5-mlgG (m13C5) se muestra en la **figura 1d**. En cada una de las figuras 1a-1d, la unión de mlgG1 se muestra como un control negativo.

La **figura 2a-c** es un conjunto de gráficos que muestran la unión de los anticuerpos quiméricos anti-PD-L1 a PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones medida por ELISA. La unión de los anticuerpos quiméricos ch5G11-hlgG4 y ch5G11-hlgG1 se muestra en la **figura 2a**. La unión de los anticuerpos quiméricos ch13C5-hlgG4, ch13C5-hlgG1 y ch8H4-hlgG4 se muestra en la **figura 2b**. La unión del anticuerpo quimérico ch8C6-hlgG4 se muestra en la **figura 2c**. En cada una de las figuras 2a-2c, la unión de hlgG4 se muestra como un control negativo.

La **figura 3a-b** es un conjunto de gráficos que muestran la unión de los anticuerpos humanizados anti-PD-L1 a PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medida por ELISA. La unión de hlgG4 de control y los anticuerpos humanizados hu5G11-hlgG1 y hu5G11-hlgG4 se muestra en la **figura 3a**. La unión de hlgG4 de control y los anticuerpos humanizados hu13C5-hlgG1 y hu13C5-hlgG4 se muestra en la **figura 3b**.

La **figura 4a-c** es un conjunto de gráficos que muestran el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 por anticuerpos de hibridoma anti-PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medido por ELISA. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por los anticuerpos de hibridoma 13C5-mlgG (m13C5), 8C6-mlgG (m8C6), 5G9-mlgG (m5G9) y 4A8-mlgG (m4A8) en comparación con mlgG1 de control se muestra en la **figura 4a**. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por los anticuerpos de hibridoma 5G11-mlgG (m5G11), 7B4-mlgG (m7B4), 4D1-mlgG (m4D1) y 8H4-mlgG (m8H4) en comparación con mlgG1 de control se muestra en la **figura 4b**. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por los anticuerpos de hibridoma 8H3-mlgG (m8H3) y 15F1-mlgG (m15F1) en comparación con mlgG1 de control se muestra en la **figura 4c**.

La **figura 5a-c** es un conjunto de gráficos que muestran el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 por anticuerpos quiméricos anti-PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medido por ELISA. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por los anticuerpos quiméricos ch5G11 hlgG4 y ch5G11 hlgG1 en comparación con hlgG4 de control se muestra en la **figura 5a**. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por el anticuerpo quimérico ch8C6-hlgG4 en comparación con hlgG4 de control se muestra en la **figura 5b**. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por los anticuerpos quiméricos ch8H4-hlgG4, ch13C5-hlgG1 y ch13C5-hlgG4 en comparación con hlgG4 de control se muestra en la **figura 5c**.

La **figura 6a-b** es un conjunto de gráficos que muestran el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 por anticuerpos humanizados anti-PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medido por ELISA. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por hlgG4 de control y los anticuerpos humanizados 5G11-hlgG1 y 5G11-hlgG4 se muestra en la **figura 6a**. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por hlgG4 de control y los anticuerpos humanizados 13C5-hlgG1 y 13C5-hlgG4 se muestra en la **figura 6b**.

La **figura 7a y 7b** muestran la unión de los anticuerpos de hibridoma anti-PD-L1 a PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medida por FACS. La unión (medida por la intensidad media de fluorescencia) de los anticuerpos de hibridoma 4A8, 15F1, 4D1, 13C5, 8H4 y 8H3 en comparación con el anticuerpo de control mlgG1 se muestra en la **figura 7a**. La unión (medida por la intensidad media de fluorescencia) de los anticuerpos de hibridoma 5G11, 8C6, 5G9 o 7B4 en comparación con el anticuerpo de control mlgG1 se muestra en la **figura 7b**.

La **figura 8** muestra la unión de los anticuerpos quiméricos anti-PD-L1 a PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medida por FACS. Se muestra la unión del anticuerpo de control hlgG4 y los anticuerpos quiméricos ch13C5-hlgG1, ch5G11-hlgG1 y ch5G11-hlgG4.

La **figura 9** muestra la unión de anticuerpos humanizados anti-PD-L1 a PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medida por FACS. Se muestra la unión del anticuerpo de control hlgG4 y los anticuerpos humanizados hu13C5-hlgG1, hu13C5-hlgG4, hu5G11-hlgG1 y hu5G11-hlgG4.

La **figura 10a y 10b** muestran el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 por anticuerpos de hibridoma anti-PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones de anticuerpo medido por FACS. El bloqueo de la unión de PD-

1/PD-L1 por el anticuerpo de control mlgG1 y los anticuerpos de hibridoma m4D1, m5G11, m13C5, m7B4 y m8H4 se muestra en la **figura 10a**. El bloqueo de la unión de PD-1/PD-L1 por el anticuerpo de control mlgG1 y los anticuerpos de hibridoma m4A8, m5G9, m8C6, m8H3 y m15F1 se muestra en la **figura 10b**.

La **figura 11** muestra el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones del anticuerpo de control hlgG4 o los anticuerpos quiméricos anti-PD-L1 ch8C6-hlgG4, ch5G11-hlgG1, ch5G11-hlgG4, ch13C5-hlgG1, ch13C5-hlgG4 o ch8H4-hlgG4, medido por FACS.

La **figura 12** muestra el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 sobre un intervalo de concentraciones del anticuerpo de control hlgG4 o los anticuerpos humanizados hu13C5-hlgG1, hu13C5-hlgG4, hu5G11-hlgG1 o huSG11-hlgG4, medido por FACS.

La **figura 13a** es un gráfico que muestra la producción de IL-2 (pg/ml) en una MLR en respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpos de hibridoma anti-PD-L1. La **figura 13b** es un gráfico que muestra la producción de IFN γ (pg/ml) en una MLR en respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpos de hibridoma anti-PD-L1. Para la **figura 13a y 13b**, los anticuerpos ensayados fueron, de izquierda a derecha, mlgG1 de control, m8C6, m4D1, m5G11, m7B4, m8H4, m5G9, m13C5, m8H3 y m15F1. También se incluyeron pocillos solo de linfocitos T y/o solo DC como controles negativos. Como se muestra en el eje de abscisas para la **figura 13a y 13b**, cada anticuerpo se ensayó a 20 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 0,02 μ g/ml y 0,002 μ g/ml.

La **figura 14a** es un gráfico que muestra la producción de IL-2 (pg/ml) en una MLR en respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpos quiméricos anti-PD-L1. La **figura 14b** es un gráfico que muestra la producción de IFN γ (pg/ml) en una MLR en respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpos quiméricos anti-PD-L1. Para la **figura 14a y 14b**, los anticuerpos ensayados fueron, de izquierda a derecha, hlgG4 de control, 8C6-hlgG4 quimérico, 8H4-hlgG4 quimérico, 5G11-hlgG4 quimérico y 13C5-hlgG1 quimérico. Como se muestra en el eje de abscisas para la **figura 14a y 14b**, cada anticuerpo se ensayó a 20 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 0,02 μ g/ml y 0,002 μ g/ml.

La **figura 15a** es un gráfico que muestra la producción de IL-2 (pg/ml) en una MLR en respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpos humanizados anti-PD-L1. La **figura 15b** es un gráfico que muestra la producción de IFN γ (pg/ml) en una MLR en respuesta a diferentes concentraciones de anticuerpos humanizados anti-PD-L1. Para la **figura 15a y 15b**, los anticuerpos ensayados fueron, de izquierda a derecha, hlgG4 de control, hu13C5-hlgG1, hu13C5-hlgG4, hu5G11-hlgG1 y huSG11-hlgG4. Como se muestra en el eje de abscisas para la **figura 15a y 15b**, cada anticuerpo se ensayó a 20 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 0,02 μ g/ml y 0,002 μ g/ml.

La **figura 16** muestra los efectos de anticuerpos quiméricos (ch) o humanizados (hu) anti-PD-L1 sobre la inhibición mediada por Treg de la producción de IFN γ (pg/ml), en una MLR alogénica con linfocitos Treg CD4+CD25+, linfocitos T CD4+CD25- y células dendríticas. Los anticuerpos ensayados fueron, de izquierda a derecha, hlgG4 de control, ch13C5-hlgG1, ch13C5-hlgG4, hu13CS-hlgG1, hu13C5-hlgG4, ch5G11-hlgG1, ch5G11-hlgG4, hu5G11-hlgG1 y hu5G11-hlgG4.

La **figura 17** muestra la producción de IFN- γ (pg/ml) desde linfocitos T en respuesta a la coestimulación con DC autólogas y anticuerpo anti-CD3, en presencia de anticuerpo humanizado anti-PD-L1 (hu13C5-hlgG1, hu13C5-hlgG4, hu5G11-hlgG1 o hu5G11-hlgG4), anticuerpo de control de isotipo (hlgG4) o sin anticuerpo.

Las **figuras 18a y 18b** muestran el efecto de anticuerpos humanizados anti-PD-L1 sobre las respuestas de linfocitos T de memoria evocados por toxina tetánica, medido por la producción de IFN- γ (pg/ml). La hlgG4 de control negativo o el anticuerpo humanizado hu13C5-hlgG1, hu13C5-hlgG4, hu5G11-hlgG1 o hu5G11-hlgG4 se ensayó a las siguientes concentraciones: 20 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 0,02 μ g/ml y 0,002 μ g/ml.

Descripción detallada

Las interacciones de PD1/PDL1 inhiben la señalización del receptor de linfocitos T al reclutar las fosfatasa SHP1 y SHP2, que interfieren con la señalización de TCR (Chemnitz *et al.* (2004) J. Immunol. 17:945-954). PD-L1 no solamente puede promover la progresión del tumor a través de la inhibición de los efectores inmunitarios que expresan PD1, sino que también modula la inmunidad mediada por células en algunas enfermedades infecciosas (Mueller *et al.* (2010) J. Clin. Invest. 120:2508-2515). Además, las respuestas alogénicas de linfocitos T efectores son susceptibles de la modulación de la ruta de PD-1 en el rechazo de injertos (Lee *et al.* (2003) J. Immunol. 171:6929-6935). Por lo tanto, la interacción de PD-1 con PD-L1 ejerce una serie vital y diversa de funciones inmunorreguladoras en la activación de linfocitos T, tolerancia y daño del tejido mediado por el sistema inmunitario. Sin embargo, la interacción puede invertirse al bloquear la unión local de PD-1 con PD-L1 (Iwai *et al.* (2002) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99: 12293-7; Brown *et al.* (2003) J. Immunol. 170:1257-66).

Se ha descubierto que PD-1 tiene una correlación con el crecimiento canceroso y el desarrollo debido a su función en la protección de las células tumorales contra la destrucción inmunitaria eficaz. Se ha revelado que su ligando, PD-L1, tiene expresión significativa sobre varios tumores de ratón y humanos, que se postula que media la evasión inmunitaria (Iwai, Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 12293-12297 (2002); Strome S. E. *et al.*, Cancer Res., 63:6501-6505 (2003); Dong *et al.* (2002) Nat. Med. 8:787-9). En seres humanos, se ha encontrado expresión de PD-1 (en linfocitos de infiltración tumoral) y/o PD-L1 (en células tumorales) en varias biopsias de tumor primario evaluadas por inmunohistoquímica. Dichos tejidos incluyen cánceres de pulmón, hígado, ovario, cuello uterino, piel, colon, glioma, vejiga, mama, riñón, esófago, estómago, células escamosas bucales, células uroteliales y páncreas, así como tumores de la cabeza y el cuello (Brown J. A. *et al.*, J. Immunol. 170: 1257-1266 (2003); Dong H. *et al.*, Nat. Med. 8: 793-800 (2002); Wintterle *et al.*, Cancer Res. 63:7462-7467 (2003); Strome S. E. *et al.*, Cancer Res., 63: 6501-6505 (2003); Thompson R. H. *et al.*, Cancer Res. 66: 3381-5(2006); Thompson *et al.*, Clin. Cancer Res. 13: 1757-61(2007); Nomi T. *et al.*, Clin. Cancer Res. 13: 2151-7 (2007)). Más sorprendentemente, la expresión del ligando de PD-1 en células tumorales se ha correlacionado con un mal pronóstico de pacientes con cáncer entre múltiples tipos de tumor (revisado en OkaZaki y Honjo, Int. Immunol. 19: 813-824 (2007)).

Aunque la interacción entre PD-1 y PD-L1 provoca una disminución en los linfocitos de infiltración tumoral, una disminución en la proliferación mediada por el receptor de linfocitos T y la evasión inmunitaria por las células cancerosas (Dong *et al.* (2003) J. Mol. Med. 81:281-7; Blank *et al.* (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54: 3 07-3 14; Konishi *et al.* (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100), el bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 mostró en consecuencia potenciar la inmunidad de linfocitos T específicos de tumor y ser de ayuda en la eliminación de las células tumorales por el sistema inmunitario. En un modelo murino de cáncer pancreático agresivo, por ejemplo, Nomi T., *et al.* (Clin. Cancer Res. 13: 2151-2157, 2007) demostraron la eficacia terapéutica del bloqueo de PD-1/PD-L1. La administración de anticuerpos dirigidos a PD-1 o PD-L1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral. El bloqueo por anticuerpos promovió de forma eficaz la infiltración de linfocitos T CD8+ reactivos al tumor en el tumor, que provocó la regulación por aumento de los efectores antitumorales, incluyendo IFN- γ , granzima B y perforina. Además, los autores mostraron que el bloqueo de PDL1/PD-1 puede combinarse de forma eficaz con quimioterapia para producir un efecto sinérgico. En otro estudio, que usaba un modelo de carcinoma escamocelular en ratones, el bloqueo por anticuerpos de PD-1 o PD-L1 inhibió significativamente el crecimiento tumoral (Tsushima F. *et al.*, Oral Oncol. 42:268-274 (2006)).

Además, la transfección de una línea murina de mastocitoma con PD-L1 dio lugar a lisis disminuida de las células tumorales cuando se cocultivaban con un clon de CTL específico de tumor. La lisis se restableció cuando se añadía un mAb anti-PD-L1 (Iwai Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 12293-12297 (2002)). *In vivo*, el bloqueo de la interacción de PD1/PD-L1 demostró aumentar la eficacia del tratamiento de transferencia adoptiva de linfocitos T en un modelo de tumor de ratón (Strome S. E. *et al.*, Cancer Res. 63:6501-6505 (2003)). Evidencias adicionales de la función de PD-1 en tratamiento contra el cáncer provienen de experimentos realizados con ratones con inactivación de PD-1. Las células de mieloma que expresaban PD-L1 crecían solamente en animales de tipo silvestre (provocando crecimiento tumoral y muerte asociada del animal), pero no en ratones deficientes de PD-1 (Iwai Y., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 12293-12297(2002)). En estudios en seres humanos, R. M. Wong *et al.* (Int. Immunol. 19:1223-1234 (2007)) mostraron que el bloqueo de PD-1 usando un anticuerpo completamente humano anti-PD-1 aumentaba los números absolutos de linfocitos T CD8+ (CTL) específicos de tumor en ensayos de estimulación *ex vivo* usando antígenos de vacuna y células de individuos vacunados. En un estudio similar, el bloqueo por anticuerpos de PD-L1 provocó actividad citolítica potenciada de los linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno asociado a tumor y producción aumentada de citocinas por linfocitos TH específicos de tumor (Blank C. *et al.*, Int. J. Cancer 119: 317-327 (2006)). Los mismos autores mostraron que el bloqueo de PD-L1 aumenta las respuestas de linfocitos T específicos de tumor *in vitro* cuando se usan en combinación con el bloqueo de anti-CTLA-4. Globalmente, la ruta de PD-1/PD-L1 es una diana para el desarrollo de productos terapéuticos de anticuerpo para el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos anti-PD-L1 también pueden ser útiles en infecciones víricas crónicas. Los linfocitos T CD8+ de memoria generados después de una infección vírica aguda son muy funcionales y constituyen un componente importante de la inmunidad protectora. En contraste, las infecciones crónicas a menudo se caracterizan por grados variables de alteración funcional (agotamiento) de respuestas de linfocitos T específicos de virus, y este defecto es una razón principal para la incapacidad del hospedador de eliminar el patógeno persistente. Aunque los linfocitos T efectores funcionales se generan inicialmente durante las fases iniciales de infección, pierden gradualmente la función durante el transcurso de una infección crónica. Barber *et al.* (Barber *et al.*, Nature 439: 682-687 (2006)) mostraron que ratones infectados con una cepa de laboratorio de LCMV desarrollaban infección crónica que provocaba niveles altos de virus en la sangre y otros tejidos. Estos ratones desarrollaron inicialmente una respuesta de linfocitos T robusta, pero finalmente sucumbían a la infección tras el agotamiento de los linfocitos T. Los autores descubrieron que la disminución en número y función de los linfocitos T efectores en ratones infectados de forma crónica podía invertirse al inyectar un anticuerpo que bloqueaba la interacción entre PD-1 y PD-L1.

En este documento se describen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al ligando 1 de muerte programada (PD-L1). En un aspecto, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen a PD-L1 humano. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden unirse a PD-L1 humano y de macaco cangrejero. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden bloquear la interacción de PD-L1 con su receptor PD-1 en linfocitos T. En este documento se describen métodos de preparación y uso de los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmentos de los

mismos, y composiciones que comprenden anticuerpos anti-PD-L1 o fragmentos de los mismos, incluyendo composiciones farmacéuticas.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína de unión que tiene al menos un dominio de unión a antígeno. Los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden ser anticuerpos completos o cualquier fragmento de los mismos. Por tanto, los anticuerpos y fragmentos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos y variantes de anticuerpo o fragmentos de los mismos, así como inmunoconjugados. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)', fragmentos Fv, regiones CDR aisladas, moléculas Fv monocaténarias (scFv) y otros fragmentos de anticuerpo conocidos en la técnica. Los anticuerpos y fragmentos de los mismos también pueden incluir polipéptidos recombinantes, proteínas de fusión y anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos divulgados en este documento pueden ser de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. En una realización, los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos divulgados en este documento son de un isotipo IgG1 o IgG4. Los anticuerpos contra PD-L1 y fragmentos de los mismos pueden obtenerse de cualquier especie incluyendo, aunque sin limitación, ratón, rata, conejo, primate, llama y ser humano. Los anticuerpos contra PD-L1 y fragmentos de los mismos pueden ser quiméricos, humanizados o anticuerpos completamente humanos. En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 son anticuerpos producidos por una línea celular de hibridoma derivada de un ratón. Por tanto, en un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 son anticuerpos murinos. En otro aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 son anticuerpos quiméricos. En un aspecto adicional, los anticuerpos quiméricos son anticuerpos quiméricos de ratón-humanos. En otro aspecto, los anticuerpos son anticuerpos humanizados. En un aspecto adicional, los anticuerpos se obtienen de anticuerpos murinos y están humanizados.

Un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que tiene al menos una parte de la región variable de la cadena pesada y al menos una parte de la región variable de la cadena ligera derivadas de una especie; y al menos una parte de una región constante derivada de otra especie. Por ejemplo, en un aspecto, un anticuerpo quimérico puede comprender regiones variables murinas y una región constante humana.

Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que contiene regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que derivan de un anticuerpo no humano; y regiones flanqueantes, así como regiones constantes que derivan de un anticuerpo humano. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-L1 proporcionados en este documento pueden comprender CDR derivadas de uno o más anticuerpos murinos y regiones flanqueantes y constantes humanas. Por tanto, en un aspecto, el anticuerpo humanizado proporcionado en este documento se une al mismo epítipo en PD-L1 que el anticuerpo murino del que se obtienen las CDR del anticuerpo. En este documento se proporcionan anticuerpos humanizados ejemplares. Anticuerpos anti-PD-L1 adicionales que comprenden las CDR de la cadena pesada y ligera proporcionadas en este documento, o variantes de los mismos, pueden generarse usando cualquier secuencia flanqueante humana. Las secuencias flanqueantes incluyen aquellas secuencias flanqueantes que son estructuralmente similares a las secuencias flanqueantes proporcionadas en este documento. Pueden hacerse modificaciones adicionales en las regiones flanqueantes para mejorar las propiedades de los anticuerpos proporcionados en este documento. Dichas modificaciones flanqueantes adicionales pueden incluir modificaciones químicas; mutaciones puntuales para reducir la inmunogenia o eliminar los epítopos de linfocitos T; o retromutación al residuo de la secuencia original de la línea germinal. Dichas modificaciones incluyen aquellas correspondientes a las mutaciones ejemplificadas en este documento, incluyendo retromutaciones a la secuencia de la línea germinal. Por ejemplo, uno o más aminoácidos en las regiones flanqueantes humanas de VH y/o VL de los anticuerpos humanizados proporcionados en este documento se retromutan al aminoácido correspondiente en el anticuerpo murino precursor. Como un ejemplo, como para VH y VL de 5G11 humanizado y 13C5 humanizado, varios sitios de la secuencia de aminoácidos flanqueante del anticuerpo humano de molde mencionado anteriormente se retromutaron a las secuencias de aminoácidos correspondientes de los anticuerpos 5G11 y 13C5 de ratón. En un aspecto, el aminoácido en las posiciones 53 y/o 60 y/o 67 de la región variable de la cadena ligera se retromuta al aminoácido correspondiente encontrado en esa posición en la región variables de la cadena ligera de 5G11 o 13C5 de ratón. En otro aspecto, el aminoácido en las posiciones 24 y/o 28 y/o 30 y/o 49 y/o 73 y/o 83 y/o 94 de la región variable de la cadena pesada se retromuta al aminoácido correspondiente encontrado en esa posición de la región variable de la cadena pesada de 5G11 o 13C5 de ratón. En un aspecto, el anticuerpo 5G11 humanizado comprende una región variable de la cadena ligera en donde el aminoácido en la posición 60 se muta de Ser (S) a Asp (D) y el aminoácido en la posición 67 se muta de Ser (S) a Tyr (Y); y una región variable de la cadena pesada en donde el aminoácido en la posición 24 se muta de Phe (F) a Val (V), el aminoácido en la posición 49 se muta de Ala (A) a Gly (G), el aminoácido en la posición 73 se muta de Thr (T) a Asn (N) y el aminoácido en la posición 83 se muta de Thr (T) a Asn (N). En un aspecto, el anticuerpo 13C5 humanizado comprende una región variable de la cadena ligera en donde el aminoácido en la posición 53 se muta de Tyr (Y) a Lys (K); y una región variable de la cadena pesada en donde el aminoácido en la posición 28 se muta de Thr (T) a Ile (I), el aminoácido en la posición 30 se muta de Ser (S) a Arg (R), el aminoácido en la posición 49 se muta de Ser (S) a Ala (A) y el aminoácido en la posición 94 se muta de Tyr (Y) a Asp (D). Pueden hacerse retromutaciones adicionales o alternativas en las regiones flanqueantes de los anticuerpos humanizados proporcionados en este documento para mejorar las propiedades de los anticuerpos. La presente divulgación abarca anticuerpos humanizados que se unen a PD-L1 y comprenden modificaciones flanqueantes correspondientes a las modificaciones ejemplares descritas en este documento con respecto a cualquier secuencia flanqueante adecuada, así como otras modificaciones flanqueantes que mejoren de otro modo las propiedades de los anticuerpos.

Como se usa en este documento, el término "derivado", cuando se usa para hacer referencia a una molécula o polipéptido con respecto a un anticuerpo de referencia u otra proteína de unión, significa una molécula o polipéptido que puede unirse con especificidad al mismo epítipo que el anticuerpo de referencia u otra proteína de unión.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos divulgados en este documento son específicos para PD-L1. En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos son específicos para PD-L1 humano. En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos proporcionados en este documento se unen a PD-L1 humano o de primate, pero no a PD-L1 de cualquier otro mamífero. En un aspecto adicional, los anticuerpos y fragmentos de los mismos no se unen a PD-L1 de ratón. Las expresiones "PD-L1 humano", "hPD-L1" y "huPD-L1" y similares se usan indistintamente en este documento y se refieren a PD-L1 humano y variantes o isoformas de PD-L1 humano. Por "específico para" se entiende que los anticuerpos y fragmentos de los mismos se unen a PD-L1 con mayor afinidad que cualquier otra diana. Como se usa en este documento, el término "CE50" se refiere a la concentración eficaz, un 50 % de la respuesta máxima del anticuerpo. Como se usa en este documento, el término "CI50" se refiere a la concentración inhibidora, un 50 % de la respuesta máxima del anticuerpo. Tanto la CE50 como la CI50 pueden medirse por análisis ELISA o FACS, o cualquier otro método conocido en la técnica.

En un aspecto, los anticuerpos anti-PD1 y fragmentos o variantes de los mismos tienen una afinidad de unión (KD) para PD-L1 en el intervalo de aproximadamente 0,001 nM a aproximadamente 100 nM, de aproximadamente 0,002 nM a aproximadamente 50 nM, de aproximadamente 0,005 nM a aproximadamente 5 nM, de aproximadamente 0,01 nM a aproximadamente 1 nM o de aproximadamente 0,05 nM a aproximadamente 0,1 nM. En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos tienen una afinidad de unión (KD) para PD-L1 de aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 20 nM o menos, aproximadamente 15 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, aproximadamente 1 nM o menos, aproximadamente 0,9 nM o menos, aproximadamente 0,8 nM o menos, aproximadamente 0,7 nM o menos, aproximadamente 0,6 nM o menos, aproximadamente 0,5 nM o menos, aproximadamente 0,4 nM o menos, aproximadamente 0,3 nM o menos, aproximadamente 0,2 nM o menos, aproximadamente 0,1 nM o menos, aproximadamente 0,09 nM o menos, aproximadamente 0,08 nM o menos, aproximadamente 0,07 nM o menos, aproximadamente 0,06 nM o menos, aproximadamente 0,05 nM o menos, aproximadamente 0,04 nM o menos, aproximadamente 0,03 nM o menos, aproximadamente 0,02 nM o menos, aproximadamente 0,01 nM o menos, aproximadamente 0,009 nM o menos, aproximadamente 0,008 nM o menos, aproximadamente 0,007 nM o menos, aproximadamente 0,006 nM o menos, aproximadamente 0,005 nM o menos, aproximadamente 0,004 nM o menos, aproximadamente 0,003 nM o menos, aproximadamente 0,002 nM o menos o aproximadamente 0,001 nM o menos. En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos tienen una afinidad de unión (KD) para PD-L1 de aproximadamente 10 nM, aproximadamente 9 nM, aproximadamente 8 nM, aproximadamente 7 nM, aproximadamente 6 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 0,9 nM, aproximadamente 0,8 nM, aproximadamente 0,7 nM, aproximadamente 0,6 nM, aproximadamente 0,5 nM, aproximadamente 0,4 nM, aproximadamente 0,3 nM, aproximadamente 0,2 nM, aproximadamente 0,1 nM, aproximadamente 0,09 nM, aproximadamente 0,08 nM, aproximadamente 0,07 nM, aproximadamente 0,06 nM, aproximadamente 0,05 nM, aproximadamente 0,04 nM, aproximadamente 0,03 nM, aproximadamente 0,02 nM, aproximadamente 0,01 nM, aproximadamente 0,009 nM, aproximadamente 0,008 nM, aproximadamente 0,007 nM, aproximadamente 0,006 nM, aproximadamente 0,005 nM, aproximadamente 0,004 nM, aproximadamente 0,003 nM, aproximadamente 0,002 nM o aproximadamente 0,001 nM.

En una realización, los anticuerpos y fragmentos proporcionados en este documento comprenden una cadena ligera y una cadena pesada, de las que cada una comprende tres regiones CDR. Se proporcionan secuencias CDR de la cadena pesada ejemplares (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) para anticuerpos contra PD-L1 a continuación en la **tabla 1**. Se proporcionan secuencias CDR de la cadena ligera ejemplares (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) para anticuerpos contra PD-L1 a continuación en la **tabla 2**. Se proporcionan regiones variables ejemplares y secuencias de la cadena pesada y ligera de longitud completa para anticuerpos contra PD-L1 a continuación en la **tabla 3**.

Tabla 1. Secuencias CDR de la cadena pesada

Nombre	HCDR	SEQ ID NO	Secuencia
13C5	1	81	SYGMS
	2	82	SISSGGSTYYPDSVKG
	3	83	GYDSGFAY
5G9	1	87	SYGMS
	2	88	SISSGGTTYYPDSVKG
	3	89	GYDSGFAY

Nombre	HCDR	SEQ ID NO	Secuencia
5G11	1	93	TYGVH
	2	94	VIWRGVTTDYNAAFMS
	3	95	LGFYAMDY
8C6	1	99	SYGVH
	2	100	VIWSGGVTDYNAAFIS
	3	101	LGFYAMDY
7B4	1	105	TYWMH
	2	106	QINPDSTTINYAPSLKD
	3	107	PGDYGDFDC
4D1	1	111	SGYWN
	2	112	YISYSGSTYYNPSLKS
	3	113	SLLWFSTGFAY
4A8	1	117	SYGVH
	2	118	VIWSGGITDYNAAFKS
	3	119	LGFYAMDY
8H4	1	123	SYGMS
	2	124	SISSGGTTYLGSVQG
	3	125	GVDAGFAY
8H3	1	129	SGYWT
	2	130	YISYTGSTYYNPSLKS
	3	131	QRDWLGFAY
15F1	1	135	SYGMS
	2	136	SISSGGSIYYPDSVKG
	3	137	GVDAGFAF

Tabla 2. Secuencias CDR de la cadena ligera

Nombre	LCDR	SEQ ID NO	Secuencia
13C5	1	84	ASQSVSTSSSSFMH
	2	85	YASNLES
	3	86	QHSWEIPYT
5G9	1	90	RASQSVSTSSSSYM
	2	91	YASNLES
	3	92	QHSWEIPYT
5G11	1	96	KASQSVSNDVA
	2	97	YAANRYT
	3	98	QQDYTSPYT
8C6	1	102	KASQSVSNDVG
	2	103	YASNRYS
	3	104	QQDYTSPYT
7B4	1	108	RSSQIIVHSNANTYLE
	2	109	KVSNRFS
	3	110	FQGSHPYT
4D1	1	114	SASSSVSSSYLY

Nombre	LCDR	SEQ ID NO	Secuencia
	2	115	NTSNLAS
	3	116	HQWRSYPPT
	1	120	SANSSVSYMH
4A8	2	121	DTSKLAS
	3	122	QQWSSNPWT
	1	126	RASQSVSTSSYSYMH
8H4	2	127	YASNLES
	3	128	QNSWEIPYT
	1	132	KSSQSLLYSSNQKNSLA
8H3	2	133	WASNRES
	3	134	QQYYSYPLT
	1	138	RASQSVSTSSYSYVH
15F1	2	139	YASNLES
	3	140	QHSWEIPYT

Tabla 3. Región variable de la cadena pesada y cadena ligera y secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de longitud completa

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
13C5 murino	Variable de la cadena pesada	2	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIIFRSYGMSWVRQTP KRLEWVASISSGGSTYYPD SVKGRFTISRDNAR NILYLQMSSLRSED TAMYDCARGYDSGFAYWGQGLVTVSE
13C5 murino	Variable de la cadena ligera	4	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSSFMHWYQQK PGQPPKLLIKYASNLESGV PARFSGSGSGTDFT LNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIKR
5G9 murino	Variable de la cadena pesada	6	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFRSYGMSWVRQTP EKRLWVASISSGGSTYYPD SVKGRFIISRDNARNILYLQMSS LRSED TAMYCAKGYDSGFAYWGQGLVIVSA
5G9 murino	Variable de la cadena ligera	8	DIVLTQSPPLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSSSYMHYQQK PGQPPKLLIKYASNLESGV PARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDT ATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
5G11 murino	Variable de la cadena pesada	10	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWRGVTTDYNAAFMSRLTITKDNSKSQVFFKMN SLQANDTAIYYCARLGFYAMDYWGQGTSTVTVSS
5G11 murino	Variable de la cadena ligera	12	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPG QSPKLLIYYAANRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITISIVQAEDLA VYFCQQDYTSPYTFGGGTKLEIK
8C6 murino	Variable de la cadena pesada	14	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWSSGVTTDYNAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNS LQANDTAIYYCARLGFYAMDYWGQGTSTVTVSS
8C6 murino	Variable de la cadena ligera	16	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVGWYQQKPG QSPKLLIYYASNRYSQVPDRFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLA VYFCQQDYTSPYTFGGGTKLEIK
7B4 murino	Variable de la cadena pesada	18	EVKLFESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFDFSTYWMHWVRQAP GQGLEWIGQINPDSTTINYAPSLKDRFIISRDNAKNTLFLQMS KVRSEDTALYYCAKPGDYGYDFDCWGQGTTLTVSS
7B4 murino	Variable de la cadena ligera	20	DVLMTQTPLYLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNANTYLEWFLQ KPGQSPKLLIYKVSNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DLGVYYCFQGSHPYTFGGGTKLEIK
4D1 murino	Variable de la cadena pesada	22	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPNG KLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRSITRDTSKNQYYLQLNSVT TEDTATYYCARSLWFSTGFAYWGQGTTLVTVSA

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
4D1 murino	Variable de la cadena ligera	24	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTLTCSASSSVSSSYLYWNQQKPGS SPKVWIYNTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAAS YFCHQWRSYPPTLGAGTKLELK
4A8 murino	Variable de la cadena pesada	26	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWSGGITDYNAAFKSRLSISKDNSKSQVFFKMNS LQANDTAIYFCARLGFYAMDYWGQGTSTVTVSS
4A8 murino	Variable de la cadena ligera	28	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSANSSVSYMHWYQQKSGTS PKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMGAEDAAT YYCQQWSSNPWTFGGGTKLEIK
8H4 murino	Variable de la cadena pesada	30	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFRSYGMSWARQIPE KRLEWVASISSGGTTYLGSVQGRFTISRDNARNILYLMSSL RSEDTAMYYCARGYDAGFAYWGQGTLSVSE
8H4 murino	Variable de la cadena ligera	32	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQ KPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEE DTATYYCQNSWEIPYTFGGGTKLEIK
8H3 murino	Variable de la cadena pesada	34	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWTWIRKFPGN KLEYMGYISYTGSTYYNPSLKSRISIRDTSKSQYYLQLNSVT TEDTATYYCARQRDWLGFAIWGQGTLSVSA
8H3 murino	Variable de la cadena ligera	36	DIVMTQTPSSLAVSLGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNSLAWY QQKPGQSPKLLIYWASNRESGVDPDRFTGSSSGTDFTLTISSVK AEDLAVYYCQYYSYPLTFGAGTKLELK

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
15F1 murino	Variable de la cadena pesada	38	EEKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFSFSSYGMSWVRQTPE KRLEWVASISSGGSIYYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSL RSED TAMYYCARGYDAGFAFWGQGTLVTASA
15F1 murino	Variable de la cadena ligera	40	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYVHWYQQ KPGQPPKLLIKYASNLESGV PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEE DTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK
5G11 humanizado	Variable de la cadena pesada	42	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTVSGFSLSTYGVHWIRQPPGK ALEWLGVIWRGVTTDYNAAFMSRLTITKDNSKNQVVLTMN NMDPVDATATYYCARLGFYAMDYWGQGTLVTVSS
5G11 humanizado	Variable de la cadena ligera	44	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGK APKLLIYYAANRYTGVPDRFSGSGYGTDFFTISSLPEDIAT YFCQQDYTSPYTFGGGTKLEIK
13C5 humanizado	Variable de la cadena pesada	46	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSAASGFIFRSYGMSWVRQAP GKGLEWVASISSGGSTIYPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYDCARGYDSGFAYWGQGTLVTVSS
13C5 humanizado	Variable de la cadena ligera	48	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASQSVSTSSSSFMHWYQQK PGQPPKLLIKYASNLESGV PARFSGSGSGTDFTLTINPVEAND TANYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
8C6-IgG4 quimérico (F234A/L235A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG4)	50	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPG KGLEWLGVWISGGVTDYNAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNS LQANDTAIYYCARLGFYAMDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
8C6 quimérico	Cadena ligera completa	52	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVSNDVGWYQQKPG QSPKLLIYYASNRYSGVPDRFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLA VYFCQQDYTSPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8H4-IgG4 quimérico (F234A/L235A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG4)	54	EVKLVESGGGLVVKPGGSLKLSAASGFTFRSYGMSWARQIPE KRLEWVASISSGGTTYLGSVQGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARGYDAGFAYWGQGLTVSVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
			SCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
8H4 quimérico	Cadena ligera completa	56	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQ KPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDTATYYCQNSWEIPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
5G11-IgG1 quimérico (D265A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG1)	58	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWRGVTTDYNAAFMSRLTITKDNSKSQVFFKMN SLQANDTAIYYCARLGFYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SG11-IgG4 quimérico (F234A/L235A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG4)	60	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTTYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWRGVTTDYNAAFMSRLTITKDNSKSQVFFKMN SLQANDTAIYYCARLGFYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVYQEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
5G11 quimérico	Cadena ligera completa	62	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVITICKASQSVSNDVAWYQQKPG QSPKLLIYYAANRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISIVQAEDLA VYFCQQDYTSPYTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEK
13C5-IgG1 quimérico (D265A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG1)	64	EVKLVESGGGLVKGPGSLKLSCAASGFIFRSYGMSWVRQTPE KRLEWVASISSGGSTYYPDYKGRFTISRDNAKNSLYLQMSSL RSEDYAMDCARGYDSGFAYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
			NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13C5-IgG4 quimérico (F234A/L235A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG4)	66	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIERSYGMSSWVRQTPE KRLEWVASISSGGSTIYPDSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSSL RSEDAMYDCARGYDSGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDPHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13C5 quimérico	Cadena ligera completa	68	DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASQSVSTSSSSFMHWYQQK PGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDT ATYYCQHSWEIPYTFGGGTKEIKRTRTVAAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
5G11-IgG1 humanizado (D265A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG1)	70	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTVSGFSLSTYGVHWIRQPPGK ALEWLGVIWRGVTTDYNAAFMSRLTITKDNSKNQVVLTMN NMDPVDATATYYCARLGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
SG11-IgG4 humanizado (F234A/L235A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG4)	72	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTVSGFSLSTYGVHWIRQPPGK ALEWLGVIWRGVTTDYNAAFMSRLTITKDNSKNQVVLTMN NMDPVDATATYYCARLGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYYTCNV DHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLGLG
5G11 humanizado	Cadena ligera completa	74	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAWYQQKPGK APKLLIYYAANRYTGVPDRFSGSGYGTDFFTISLQPEDIAT YFCQQDYTSPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
			GEC
13C5-IgG1 humanizado (D265A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG1)	76	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFIFRSYGMSWVRQAP GKGLEWVASISSGGSTYYPDSVKGRFTISRDNANKSLYLQMN SLRAEDTAVYDCARGYDSGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

Nombre	Región	SEQ ID NO	Secuencia
13C5-IgG4 humanizado (F234A/L235A)	Cadena pesada de longitud completa (IgG4)	78	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFIERSYGMSWVRQAP GKGLEWVASISSGGSTYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYDCARGYDSGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTK VDKRVEISKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLG
13C5 humanizado	Cadena ligera completa	80	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASQSVSTSSSSFMHWYQQK PGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTINPVEAND TANYCYQHSWEIPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

- En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden las CDR de la cadena ligera y las CDR de la cadena pesada de los anticuerpos 13C5, 5G9, 5G11, 8C6, 7B4, 4D1, 4A8, 8H4, 8H3 y/o 15F1. Los expertos en la materia comprenderán que las CDR de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos proporcionados en este documento pueden seleccionarse independientemente, o mezclarse y emparejarse, para formar un anticuerpo o fragmento de unión del mismo que comprenda cualquier CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada; y cualquier CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de los anticuerpos proporcionados en este documento. Por tanto, la divulgación proporciona anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129 y 135; una CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130 y 136; una CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131 y 137; una CDR1 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132 y 138; una CDR2 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133 y 139; y una CDR3 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 134 y 140. En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden regiones CDR de la cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de homología con la CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera o pesada correspondiente proporcionada en este documento. En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden regiones CDR de la cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones, eliminaciones o inserciones aminoacídicas con respecto a la CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera o pesada correspondiente proporcionada en este documento.
- En un aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una cadena pesada variable de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 13C5, 5G9, 5G11, 8C6, 7B4, 4D1, 4A8, 8H4, 8H3 y/o 15F1 y una cadena ligera variable de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 13C5, 5G9, 5G11, 8C6, 7B4, 4D1, 4A8, 8H4, 8H3 y/o 15F1. En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos proporcionados en este documento comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al

menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % homóloga con una región variable de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 y 46. En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos proporcionados en este documento comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46 o una variante de la misma, en donde la variante comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones o eliminaciones aminoacídicas, o una combinación de las mismas. En un aspecto adicional, las sustituciones aminoacídicas son sustituciones conservativas.

En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos proporcionados en este documento comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % homóloga con una región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 o 48. En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos proporcionados en este documento comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 o una variante de la misma, en donde la variante comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones, inserciones o eliminaciones aminoacídicas, o una combinación de las mismas. En un aspecto adicional, las sustituciones aminoacídicas son sustituciones conservativas.

Los anticuerpos anti-PD-L1 divulgados en este documento que tienen una o más sustituciones, inserciones, eliminaciones aminoacídicas o combinación de las mismas en la CDR o región variable de la cadena ligera o pesada conservan la actividad biológica del correspondiente anticuerpo anti-PD-L1 que no tiene una sustitución, inserción o eliminación aminoacídica. Por tanto, los anticuerpos anti-PD-L1 variantes proporcionados en este documento conservan la unión a PD-L1. El porcentaje de homología, como se usa en este documento, se refiere al número de secuencias de aminoácidos idénticas compartidas por dos secuencias de referencia, dividido por el número total de posiciones aminoacídicas, multiplicado por 100.

En algunos aspectos, los anticuerpos anti-PD-L1 proporcionados en este documento comprenden sustituciones aminoacídicas conservativas. Los expertos en la materia reconocerán que una sustitución aminoacídica conservativa es una sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que tiene una propiedad estructural o química similar, tal como, por ejemplo, una cadena lateral similar. En la técnica se describen sustituciones conservativas ejemplares, por ejemplo, en Watson *et al.*, Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Publication Company, 4.^a Ed. (1987).

Los expertos en la materia entenderán que las cadenas ligera variable y pesada variable pueden seleccionarse independientemente, o mezclarse y emparejarse, de los anticuerpos proporcionados en este documento. Por tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una región variable de la cadena pesada que tiene al menos un 80 % de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42 y 46; y una región variable de la cadena ligera que tiene al menos un 80 % de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 y 48.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo que uno cualquiera de los anticuerpos ejemplares divulgados en este documento. Por tanto, en un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que compiten por la unión a PD-L1 con los anticuerpos ejemplares proporcionados en este documento.

Los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos proporcionados en este documento pueden comprender además modificaciones en la región Fc para alterar las funciones efectoras. Las modificaciones en Fc pueden ser inserciones, eliminaciones o sustituciones aminoacídicas, o pueden ser modificaciones químicas. Por ejemplo, pueden hacerse modificaciones en la región Fc para aumentar o disminuir la unión del complemento, para aumentar o disminuir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, o para aumentar o disminuir la semivida del anticuerpo. Algunas modificaciones en Fc aumentan o disminuyen la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fc γ tal como Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII o Fc γ Rn. Se han descrito en la técnica diversas modificaciones en Fc, por ejemplo, en Shields *et al.*, J Biol. Chem 276; 6591 (2001); Tai *et al.* Blood 119; 2074 (2012); Spiekermann *et al.* J Exp. Med 196; 303 (2002); Moore *et al.* mAbs 2:2; 181 (2010); Medzhradsky Methods in Molecular Biology 446; 293 (2008); Mannan *et al.* Drug Metabolism and Disposition 35; 86 (2007); y Idusogie *et al.* J Immunol 164; 4178 (2000). En algunos aspectos, se alteran los patrones de glucosilación de la región Fc. En otros aspectos, la región Fc se modifica por pegilación (por ejemplo, haciendo reaccionar el anticuerpo o fragmento del mismo con polietilenglicol (PEG)).

En una realización, los anticuerpos o fragmentos de los mismos proporcionados en este documento son inmunocnjugados que comprenden un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento del mismo y que comprenden además un agente seleccionado del grupo que incluye un agente terapéutico adicional, un agente citotóxico, una molécula de

inmunoadhesión y un agente de imágenes. En algunos aspectos, el agente de imágenes se selecciona del grupo que consiste en un radiomarcador, una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético y biotina. En algunos aspectos, el agente de imágenes es un radiomarcador seleccionado del grupo que consiste en: ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho y ^{153}Sm . En algunos aspectos, el agente terapéutico o agente citotóxico se selecciona del grupo que incluye un agente quimioterápico, un agente inmunosupresor, un agente inmunoestimulador, un antimetabolito, un agente alquilante, un antibiótico, un factor de crecimiento, una citocina, un agente antiangiogénico, un agente antimitótico, una antraciclina, una toxina y un agente apoptótico. En algunos aspectos, la proteína de unión se conjuga directamente con el agente. En otros aspectos, la proteína de unión se conjuga con el agente mediante un conector. Conectores adecuados incluyen, aunque sin limitación, conectores aminoácidos y polipeptídicos divulgados en este documento. Los conectores pueden ser escindibles o no escindibles.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos específicos para PD-L1 y al menos otro antígeno o epítipo. Los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos proporcionados en este documento pueden ensayarse para la unión a PD-L1 usando los ensayos de unión proporcionados en este documento, o cualquier otro ensayo de unión conocido en la técnica.

Salvo que se indique de otro modo, la práctica de la presente invención emplea técnicas convencionales de biología molecular, biología celular, bioquímica e inmunología que son bien conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989), *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Immunobiology* (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Phage display: a laboratory manual* (C. Barbas III *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); y *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)).

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto por una enfermedad o afección sensible a potenciación, estimulación o provocación de una respuesta inmunitaria. Como se usa en este documento, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen aquellos sujetos que ya tienen la enfermedad o afección, así como aquellos que pueden desarrollar la enfermedad o afección y en los que el objetivo es prevenir, retardar o disminuir la enfermedad o afección. Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en este documento, se refiere a la cantidad de un compuesto o composición que es necesaria para proporcionar un beneficio terapéutico y/o preventivo al sujeto.

En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos son útiles en el tratamiento de tumores sólidos o neoplasias hemáticas. Por tanto, en un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento del cáncer. "Cáncer", como se usa en este documento, se refiere al estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluyendo liposarcoma, sarcoma osteógeno, angiosarcoma, endoteliosarcoma, leiomiomasarcoma, cordoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, rabdomiosarcoma, fibrosarcoma, mixosarcoma, condrosarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, sinovioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias linfáticas. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer escamocelular (por ejemplo, cáncer escamocelular epitelial), linfoma de Hodgkin; linfomas no hodgkinianos (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño/linfoma linfocítico crónico, micosis fungoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma grande difuso de linfocitos B, linfoma de la zona marginal, tricoleucemia y leucemia linfoplasmocítica), tumores de células precursoras de linfocitos, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos B, y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T, timoma, tumores de linfocitos T maduros y NK, incluyendo leucemias periféricas de linfocitos T, leucemia de linfocitos T adultos/linfomas de linfocitos T y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mielógenas tales como leucemias mielógenas agudas, incluyendo AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos, y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica, leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos B, leucemia/linfoma linfoblástico agudo de linfocitos T, cáncer de pulmón, incluyendo cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, carcinoma pulmonar microcítico, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de la glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del conducto biliar, tumor de Ewing, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de la glándula sudorípara, carcinoma de la glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma de vejiga,

carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, leucemia, linfoma, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad mielodisplásica, enfermedad de la cadena pesada, tumores neuroendocrinos, schwannoma y otros carcinomas, así como cáncer de cabeza y cuello.

En una realización, los anticuerpos y fragmentos de los mismos proporcionados en este documento son útiles en el tratamiento de enfermedades provocadas por agentes infecciosos. Los agentes infecciosos incluyen, aunque sin limitación, agentes bacterianos, micológicos, parasitarios y víricos. Ejemplos de dichos agentes infecciosos incluyen los siguientes: estafilococos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Escherichia coli*, estreptococos, *Neisseriaceae*, cocos, enterobacterias, enterococos, enterococos resistentes a vancomicina, criptococos, histoplasmosis, *Aspergillus*, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Campylobacter*, *Pasteurellaceae*, *Bordetella*, *Francisella*, *Brucella*, *Legionellaceae*, *Bacteroidaceae*, bacilos gramnegativos, *Clostridium*, corinebacterias, propionibacterias, bacilos grampositivos, *Bacillus anthracis*, *Actinomyces*, *Nocardia*, micobacterias, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*, micoplasma, ureaplasma, rickettsia, clamidias, cándida, micosis sistémica, micosis oportunista, protozoos, nematodos, cestodos, adenovirus, herpesvirus (incluyendo, por ejemplo, virus del herpes simple y virus de Epstein Barr, y virus del zóster), poxvirus, papovavirus, virus de la hepatitis (incluyendo, por ejemplo, virus de la hepatitis B y virus de la hepatitis C), papilomavirus, ortomixovirus (incluyendo, por ejemplo, gripe A, gripe B y gripe C), paramixovirus, coronavirus, picornavirus, reovirus, togavirus, flavivirus, bunyavirus, rabdovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana y retrovirus. Enfermedades infecciosas incluyen, aunque sin limitación, candidiasis, candidemia, aspergilosis, neumonía estreptocócica, afecciones estreptocócicas de la piel y orofaríngeas, septicemia gramnegativa, tuberculosis, mononucleosis, gripe, enfermedad respiratoria provocada por el virus sincitial respiratorio, paludismo, esquistosomosis y tripanosomosis.

En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos proporcionados en este documento son útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos T de tipo 2 T-auxiliares (Th2), tales como, por ejemplo, asma, alergia o enfermedad de injerto contra hospedador.

En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos proporcionados son útiles para la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, en un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de los mismos pueden administrarse junto con un antígeno de interés con el propósito de provocar una respuesta inmunitaria contra dicho antígeno. Un antígeno de interés puede ser un antígeno asociado con un patógeno tal como un virus o bacteria. Por tanto, en un aspecto, la presente divulgación proporciona una vacuna que comprende un anticuerpo anti-PD-L1 y un antígeno, en donde la vacuna provoca una respuesta inmunitaria específica de antígeno.

En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 proporcionados en este documento modulan la función de los linfocitos T reguladores. Los linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺ son linfocitos que suprimen o reducen los efectos de las funciones de los linfocitos T efectores. Las expresiones "linfocito T regulador" y "Treg" se usan indistintamente en este documento. En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 proporcionados en este documento evitan o invierten los efectos inhibidores de los linfocitos T reguladores sobre la producción de citocinas de linfocitos T efectores. Por ejemplo, en un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 proporcionados en este documento restablecen la capacidad de producción de IFN γ de los linfocitos T efectores en contacto con linfocitos T reguladores.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos divulgados en este documento pueden administrarse al sujeto mediante al menos una vía seleccionada de parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavidad, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraósea, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intramedular, intrasinovial, intratorácica, intratimpánica, intrauterina, intravesical, intravítrea, en embolada, subconjuntival, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, intratumoral y transdérmica.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos divulgados en este documento pueden administrarse a un sujeto que lo necesite en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En un aspecto, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden administrarse a un sujeto antes, durante y/o después de la administración al sujeto del agente terapéutico adicional. En un aspecto, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterápico, agente radioterápico, citocina, anticuerpo o fragmento del mismo, o cualquier otro agente terapéutico adicional que esté indicado para la enfermedad a tratar. En un aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 y el agente terapéutico adicional presentan sinergia terapéutica cuando se administran conjuntamente, ya sea simultáneamente o secuencialmente. En un aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 y el agente terapéutico adicional se administran en formulaciones separadas. En otro aspecto, el anticuerpo anti-PD-L1 y el agente terapéutico adicional se administran en la misma formulación. En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos proporcionados en este documento potencian el efecto inmunomodulador del uno o más agentes terapéuticos adicionales. En otro aspecto, el uno o más agentes terapéuticos adicionales potencian el efecto del anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento del mismo.

La presente invención proporciona anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos y fragmentos, así como composiciones que comprenden dichos anticuerpos aislados, fragmentos y ácidos nucleicos. El término "aislado" se refiere a un compuesto de interés (por

ejemplo, un anticuerpo o ácido nucleico) que se ha separado de su entorno natural. La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos aislados o fragmentos de los mismos, o ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos o fragmentos, y que comprenden además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, excipientes, diluyentes, materiales de encapsulación, rellenos, tampones u otros agentes.

El uso del singular incluye el plural salvo que se indique específicamente de otro modo. La palabra "un/o" o "una" significa "al menos uno" salvo que se indique específicamente de otro modo. El uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique de otro modo. El significado de la expresión "al menos uno" es equivalente al significado de la expresión "uno o más". Además, el uso de la expresión "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos o componentes que comprenden una unidad como elementos o componentes que comprenden más de una unidad, salvo que se indique específicamente de otro modo.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpo monoclonal contra hPD-L1. Inmunización de ratones con hPD-L1-marca His y hPD-L1-mFc

Para generar anticuerpos contra el PD-L1 humano, se obtuvieron los ADNc que codifican la pauta abierta de lectura del dominio extracelular de hPD-L1 fusionada con una marca de histidina (hPD-L1-marca His, SEQ ID NO:143 y 144), Fc de ratón (hPD-L1-mFc, SEQ ID NO:145 y 146), y marca de Fc humano (hPD-L1-hFc, SEQ ID NO: 147 y 148) por PCR y se subclonaron en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen CAT n.º: V-790), respectivamente. Después de la expresión transitoria en células Freestyle 293, se purificó hPD-L1-marca His con columna de NTA (GE healthcare), se purificaron hPD-L1-mFc y hPD-L1-hFc con columna de proteína G (GE healthcare).

Ratones BALB/cJ se inmunizaron por vía subcutánea cada 2 semanas durante 6 semanas con proteína recombinante hPD-L1-marca His (100 µg/ratón) o hPD-L1-mFc emulsionada con un volumen igual de adyuvante completo/incompleto de Freund. Tres días antes de la fusión, los ratones recibieron refuerzo por inyección intravenosa del antígeno sin adyuvante. Los esplenocitos (1×10^8) del ratón inmunizado se fusionaron con células de mieloma SP2/0 ($1,5 \times 10^7$) con PEG Hybri-Max (Sigma Inc., CAT n.º: 7181). Después de la fusión, las células se distribuyeron en placas de 96 pocillos a 0,1 ml por pocillo y se incubaron a 37 °C, estufa de incubación de un 5 % de CO₂. En el día 1, las células se alimentaron añadiendo 0,1 ml adicional por pocillo con medio que contenía suero y HAT más metotrexato 2x. En el día 3 y día 7, se reemplazó 0,1 ml de medio de cada pocillo con 0,1 ml de medio HT reciente. El cribado se produjo típicamente entre los días 9-14, y el sobrenadante de cultivo se ensayó para el anticuerpo que reacciona con hPD-L1-hFc por ELISA.

Para clonar la célula de hibridoma seleccionada, se realizó dilución limitante cuatro veces. Las células de hibridoma se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO; Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.) que contenía un 10 % de suero fetal de ternero, un 1 % de penicilina/estreptomicina, un 2 % de L-glutamina y un 1 % de solución de NaHCO₃ ajustada. Las células de hibridoma seleccionadas entonces se adaptaron en medio de cultivo sin suero y el anticuerpo se purificó del sobrenadante usando columna de proteína G (GE healthcare). Después de lavar con PBS, los anticuerpos unidos se eluyeron usando glicina 0,1 M pH 3,0, seguido de neutralización del pH usando Tris 2,0 M. Se usaron concentradores centrífugos Ultra-15 (Amicon) para el intercambio de tampón y la concentración del anticuerpo.

Ejemplo 2: Clonación y humanización de secuencias de ADNc de anticuerpos anti-PD-L1. Clonación de ADNc de inmunoglobulina

El ARN total aislado de la línea celular de hibridoma que produce anticuerpo contra hPD-L1 mediante RNeasy Mini Kit (Qiagen, CAT n.º: 74104) se usó como molde para sintetizar ADNc de primera hebra con retrotranscriptasa SuperScript® II (Life Technology, CAT n.º: 18064-14) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de ADNc entonces se sometió a PCR en una mezcla de reacción de 50 µl de volumen usando cebadores degenerados de IgG de ratón (Kettleborough CA, *et al.*, European Journal of Immunology 23: 206-211 (1993), Strebe N, *et al.*, Antibody Engineering 1:3-14 (2010)). La reacción se realizó en un termociclador S1000™ (Bio-Rad, CAT n.º: 184-2000) con 30 ciclos de: 94 °C, 1,5 minutos para la desnaturalización; 50 °C, 1 minuto para la hibridación; y 72 °C, 1 minuto para la síntesis. Al final del 30.º ciclo, la mezcla de reacción se incubó otros 7 minutos a 72 °C para la extensión.

La mezcla de PCR se sometió a electroforesis en un gel de un 1 % de agarosa/Tris-borato que contenía 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Los fragmentos de ADN que tenían los tamaños esperados (aproximadamente 450 pb para la cadena pesada y la cadena ligera) se escindieron del gel y se purificaron. Se clonaron 3 µl de producto de PCR purificado en el vector pMD-18T (Takara, CAT n.º: D101A) y se transformaron en *E. coli* químicamente competente One Shot® TOP10 (Invitrogen, CAT n.º: C4040-03). Los clones se cribaron por PCR de colonias usando cebadores universales M13 directos e inversos, y 10 clones positivos de cada reacción se eligieron para la secuenciación de ADN en ambas direcciones usando los cebadores M13 directo y M13 inverso.

Las secuencias de la región variable pesada y ligera de los anticuerpos m4A8 (SEQ ID NO: 25-28), m4D1 (SEQ ID NO: 21-24), m5G9 (SEQ ID NO: 5-8), m5G11 (SEQ ID NO: 9-12), m8C6 (SEQ ID NO: 13-16), m8H3 (SEQ ID NO: 33-36), m8H4 (SEQ ID NO: 29-32), m7B4 (SEQ ID NO: 17-20), m13C5 (SEQ ID NO: 1-4) y m15F1 (SEQ ID NO: 37-40) se amplificaron a partir de los clones de hibridoma correspondientes. Estos anticuerpos mostraban funciones deseadas, tales como bloqueo de la unión de PD-L1 a PD-1, y activación potenciada de linfocitos T y liberación de citocinas.

Construcción y expresión de anticuerpo quimérico 5G11 y 13C5

Las cadenas ligeras quiméricas de 8C6, 8H4, 5G11 y 13C5 (SEQ ID NO: 52, 56, 62 y 68, respectivamente) se construyeron ligando los ADNc clonados por PCR de regiones VL de ratón a la región constante de la cadena kappa humana, respectivamente. Las cadenas pesadas quiméricas de 8C6, 8H4, 5G11 y 13C5 (SEQ ID NO: 50 (8C6-IgG4), 54 (8H4-IgG4), 58 (5G11-IgG1), 60 (5G11-IgG4), 64 (13C5-IgG1) y 66 (13C5-IgG4)) se construyeron ligando los ADNc clonados por PCR de regiones VH de ratón a regiones constantes de IgG1 e IgG4 humanas. Los 5 extremos de las secuencias de ADNc de ratón se modificaron usando cebadores de PCR diseñados para añadir una secuencia líder tanto a la cadena ligera y cadena pesada.

Se transfectaron células Freestyle 293 (200 ml a 10^6 /ml) con 100 µg de cada uno de los plásmidos de expresión de la cadena pesada y ligera quimérica y se cultivaron durante 6 días. El anticuerpo quimérico en el sobrenadante entonces se purificó con columna de proteína G (GE healthcare). La unión del anticuerpo quimérico con PD-L1 se midió por ELISA y Biacore, y se demostró que se une a PD-L1 con afinidad comparable a la del anticuerpo precursor murino.

Diseño de humanización de anticuerpos

Los anticuerpos 5G11 y 13C5 se humanizaron usando la estrategia de injerto de CDR (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.225.539). Las secuencias de la cadena variable de la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo murino 5G11 y 13C5 se compararon con las disponibles en el banco de datos de proteínas Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/igblast.cgi>). Los modelos de 5G11 y 13C5 se generaron respectivamente en función de la estructura de VH y VL con la homología de secuencia más alta.

Los anticuerpos humanos de molde a injertar con las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en la VH y VL del anticuerpo de ratón 5G11 y 13C5 se seleccionaron de líneas germinales de anticuerpo humano que tenían alta homología de secuencia con el anticuerpo de ratón 5G11 y 13C5 mediante búsqueda en el ciber sitio del sistema internacional de información inmunogenética (<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>). Para 5G11, la VH humana de molde seleccionada fue una combinación de IGHV2-5*10 e IGHJ4*01, y la VL humana de molde seleccionada fue una combinación de IGKV1-33*01 e IGKJ2*01. Para 13C5, la VH humana de molde seleccionada fue una combinación de IGHV3-21*04 e IGHJ4*01, y la VL humana de molde seleccionada fue una combinación de IGKV7-3*01 e IGKJ2*01.

Las secuencias de aminoácidos de CDR de los anticuerpos humanos de molde mencionados anteriormente se sustituyeron por las CDR de los anticuerpos de hibridoma (de ratón) 5G11 (SEQ ID NO: 93-98) y 13C5 (SEQ ID NO: 81-86). Las regiones flanqueantes de las VH y VL de anticuerpo humano de molde mencionadas anteriormente se injertaron con las secuencias de aminoácidos necesarias de VH y VL del anticuerpo de ratón 5G11 y 13C5 para dar un anticuerpo humanizado funcional. Como para VH y VL de 5G11 y 13C5, varios sitios de la secuencia de aminoácidos flanqueante del anticuerpo humano de molde mencionado anteriormente se retromutaron a las secuencias de aminoácidos correspondientes del anticuerpo 5G11 y 13C5 de ratón. Para la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 5G11 humanizado, el aminoácido en la posición 60 se muta de Ser (S) a Asp (D) y el aminoácido en la posición 67 se muta de Ser (S) a Tyr (Y); y para la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 5G11 humanizado, el aminoácido en la posición 24 se muta de Phe (F) a Val (V), el aminoácido en la posición 49 se muta de Ala (A) a Gly (G), el aminoácido en la posición 73 se muta de Thr (T) a Asn (N) y el aminoácido en la posición 83 se muta de Thr (T) a Asn (N). Para la región variable de la cadena ligera de 13C5 humanizado, el aminoácido en la posición 53 se muta de Tyr (Y) a Lys (K); y para la región variable de la cadena pesada de 13C5 humanizado, el aminoácido en la posición 28 se muta de Thr (T) a Ile (I), el aminoácido en la posición 30 se muta de Ser (S) a Arg (R), el aminoácido en la posición 49 se muta de Ser (S) a Ala (A) y el aminoácido en la posición 94 se muta de Tyr (Y) a Asp (D). Las secuencias de aminoácidos de VH y VL de 5G11 humanizado se proporcionan como SEQ ID NO: 42 y 44, respectivamente; las secuencias de ADN que codifican la VH y VL de 5G11 humanizado se proporcionan como SEQ ID NO: 41 y 43, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de VH y VL de 13C5 humanizado se proporcionan como SEQ ID NO: 46 y 48, respectivamente; las secuencias de ADN que codifican la VH y VL de 13C5 humanizado se proporcionan como SEQ ID NO: 45 y 47, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa para los anticuerpos humanizados 5G11 y 13C5 se proporcionan como SEQ ID NO: 74 y 80, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican el 5G11 y 13C5 humanizado de longitud completa se proporcionan como SEQ ID NO: 73 y 79, respectivamente. Se produjeron las versiones IgG1 e IgG4 de los anticuerpos 5G11 y 13C5 humanizados. La región constante IgG1 porta la mutación D265A (Clynes R, *et al.*, Nature Medicine 6: 443-446 (2000)), mientras que la región constante de IgG4 tiene la doble

mutación F234A y L235A (Xu D, *et al.*, Cellular Immunology 200: 16-26 (2000)). Las secuencias de ADN y aminoácidos para la cadena pesada de IgG1 de longitud completa del anticuerpo humanizado 5G11-hlgG1 se proporcionan como SEQ ID NO: 69 y 70, respectivamente. Las secuencias de ADN y aminoácidos para la cadena pesada de IgG4 de longitud completa del anticuerpo humanizado 5G11-hlgG4 se proporcionan como SEQ ID NO: 71 y 72, respectivamente. Las secuencias de ADN y aminoácidos para la cadena pesada de IgG1 de longitud completa del anticuerpo humanizado 13C5-hlgG1 se proporcionan como SEQ ID NO: 75 y 76, respectivamente. Las secuencias de ADN y aminoácidos para la cadena pesada de IgG4 de longitud completa del anticuerpo humanizado 13C5-hlgG4 se proporcionan como SEQ ID NO: 77 y 78, respectivamente.

Construcción y expresión de anticuerpo humanizado 5G11 y 13C5

Se sintetizó el ADN que codifica la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado 5G11 y 13C5 y se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen, CAT: n.º V-790). Se transfectaron células Freestyle 293 (200 ml a 10^6 /ml) con 100 µg de cada uno de los plásmidos de expresión de la cadena pesada y ligera humana y se cultivaron durante 6 días. El anticuerpo humanizado en el sobrenadante entonces se purificó con columna de proteína G (GE healthcare).

La cinética de unión entre PD-L1 y anticuerpos contra PD-L1 se midió por análisis Biacore, que se realizó a 25 °C en un instrumento Biacore3000 y se registró con una tasa de recogida de datos de 1 Hz. El anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón (GE, BR-1008-38) se diluyó con acetato de sodio 10 mM pH 5,0 y se inmovilizó en cubetas de lectura de referencia y de experimento de un chip biosensor CM5 hasta aproximadamente 15 000 UR usando un kit de acoplamiento de amina (GE, BR10050). Al inicio de cada ciclo, se inyectó el anticuerpo de ensayo diluido (1,5 µg/ml) sobre la cubeta de lectura de experimento durante 1 minuto para capturarlo. Se prepararon series de analito PD-L1 diluyendo las soluciones madre con tampón de migración hasta 100 nM seguido de dilución en serie 2X en el mismo tampón hasta 0,78 nM. Los analitos se inyectaron en serie sobre las cubetas de lectura de referencia y de experimento durante 3 minutos a un caudal de 30 µl/minuto. Se dejó que el tampón de migración (PBS con un 0,05 % de P20) fluyera durante 10 minutos a un caudal de 30 µl/minuto. Al final de cada ciclo, la superficie del biosensor se regeneró con inyección de 3 minutos de tampón glicina-HCl 10 mM pH1,7 a un caudal de 10 µl/minuto. Por cada inyección de muestra de analito (es decir, cada ciclo), las respuestas de unión obtenidas de la superficie del biosensor experimental se referenciaron doblemente sustrayendo las respuestas registradas simultáneamente de la superficie de referencia seguido de sustracción adicional de las respuestas de una muestra de tampón de migración referenciada individualmente. Las constantes de velocidad de asociación y disociación (k_a y k_d) se determinaron simultáneamente ajustando los sensogramas referenciados doblemente de la serie de valoración completa a un modelo de Langmuir (1:1) usando el programa informático Biaevaluation 4.0. La constante de disociación, K_D , se calculó a partir de las constantes de velocidad determinadas mediante la relación $K_D = k_d/k_a$. La afinidad de unión de anticuerpos anti-PD-L1 con PD-L1 humano y PD-L1 de macaco cangrejero (cyno-PD-L1) se resume en la **tabla 4**.

Tabla 4. Afinidad de unión a PD-L1 de anticuerpos anti-PD-L1

Anticuerpo seleccionado	Antígeno	K_D (M)
m4A8	PD-L1 humano	2,33E-9
m4D1	PD-L1 humano	4,39E-9
m5G9	PD-L1 humano	4,78E-9
m5G11	PD-L1 humano	1,90E-10
m7B4	PD-L1 humano	6,01E-9
m8H3	PD-L1 humano	6,60E-9
m8H4	PD-L1 humano	4,56E-9
m8C6	PD-L1 humano	1,53E-9
m13C5	PD-L1 humano	1,35E-9
m15F1	PD-L1 humano	3,59E-9
ch5G11	PD-L1 humano	2,86E-10
ch13C5	PD-L1 humano	2,28E-09
hu5G11	PD-L1 humano	2,25E-10
hu13C5	PD-L1 humano	1,74E-09
hu5G11	Cyno-PD-L1	2,75E-10
hu13C5	Cyno-PD-L1	2,43E-09

Ejemplo 3: Análisis de unión basado en ELISA de anticuerpos anti-PD-L1

Se realizaron análisis de unión ELISA basados en proteína humana PD-L1-mFc (para la detección de anticuerpo quimérico y humanizado) y PD-L1-hFc (para la detección de anticuerpo de hibridoma). Placas de 96 pocillos (Costar, Cat n.º: 9018) se recubrieron con 100 µl de PD-L1-mFc a 2 µg/ml (Crownbio) en tampón de recubrimiento PBS (Hyclone, Cat n.º: SH30256.01B) durante una noche a 4 °C. Los pocillos se aspiraron y se bloquearon los sitios de unión no específica añadiendo 200 µl de tampón de bloqueo (PBS con un 1 % (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA, Roche, Cat n.º: 738328)) e incubando durante 1 hora a 37 °C. Después de que las placas se lavaran tres veces con tampón de lavado (PBS con un 0,05 % (v/v) de Tween20 (Sigma, Cat n.º: P1379)), se añadieron 100 µl/pocillo de diluciones en serie 1:10 de anticuerpos anti-PD-L1 de hibridoma (**figura 1**), quiméricos (**figura 2**) o humanizados (**figura 3**) en tampón de bloqueo (partiendo de 20 µg/ml) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron y se incubaron con 100 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H+L) (Thermo, Cat n.º: 31432) en tampón de bloqueo durante 60 min. Después de que las placas se lavaran, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de sustrato TMB (eBioscience, Cat n.º: 00-4201-56) y las placas se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl/pocillo de solución de parada (2N H₂SO₄) para detener la reacción. Se revelaron las señales colorimétricas y se leyeron a 450 nm usando un Auto Plate SpectraMax Plus (proveedor: Molecular Devices; modelo: MNR0643; programa informático: SoftMax Pro v5.4). Los datos se analizaron usando GraphPad Prism 5 y se calculó la CE50 (**figuras 1-3; tablas 5-7**). Estos datos demostraron que los anticuerpos anti-PD-L1 (de hibridoma, quiméricos y humanizados) se unen a PD-L1, medidos por ELISA.

Tabla 5. CE50 de unión basada en ELISA de anticuerpo monoclonal de hibridoma anti-PD-L1 con PD-L1

Ab de hibridoma	m5G11	m7B4	m4D1	m8H4	m13C5
CE50 ng/ml	45,9	31,42	7,14	29,04	65,1
Ab de hibridoma	m8C6	m5G9	m4A8	m8H3	m15F1
CE50 ng/ml	18,2	31,2	57,6	48,7	48,7

Tabla 6. CE50 de unión basada en ELISA de anticuerpo quimérico anti-PD-L1 con PD-L1

Ab quimérico	ch5G11 hlgG1	ch5G11 hlgG4	ch8C6 hlgG4	ch8H4 hlgG4	ch13C5 hlgG1	ch13C5 hlgG4
CE50 ng/ml	82,1	90	76	133,6	72,1	118

Tabla 7. CE50 de unión basada en ELISA de anticuerpo humanizado anti-PD-L1 con PD-L1

Ab humanizado	hu13C5 hlgG1	hu13C5 hlgG4	hu5G11 hlgG1	hu5G11 hlgG4
CE50 (ng/ml)	85,6	126,82	49,5	69,9

Se realizaron análisis de bloqueo de ligando basados en ELISA mediante el bloqueo de la unión de PD-L1-mFc humano biotinilado a PD-1-hFc humano. El antígeno PD-1-hFc (Crownbio) se suspendió en tampón PBS (2 µg/ml, 100 µl/pocillo) y se recubrió sobre la placa de 96 pocillos (Costar, Cat n.º: 9018) a 4 °C durante una noche. Los pocillos se aspiraron y se bloquearon los sitios de unión no específica añadiendo 200 µl de tampón de bloqueo (PBS con un 1 % (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA, Roche, Cat n.º: 738328)) e incubando durante 1 hora a 37 °C. Después de que la placa se lavara tres veces con tampón de lavado (PBS con un 0,05 % (v/v) de Tween20 (Sigma, Cat n.º: P1379)), se añadieron 100 µl/pocillo de diluciones en serie 1:3 de anticuerpos anti-PD-L1 de hibridoma (**figura 4**), quiméricos (**figura 5**) o humanizados (**figura 6**) en tampón de bloqueo (partiendo de 20 µg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después se añadieron 100 µl de PD-L1-mFc-biotina (0,1 µg/ml) a cada pocillo y se incubaron a 37 °C durante 2 h. Después de que la placa se lavara 3 veces, se añadió anticuerpo secundario (Avidin HRP eBioscience cat n.º: E07418-1632, 1:500, 100 µl/pocillo) y se incubó a 37 °C durante 0,5 hora. Después de que la placa se lavara, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de sustrato TMB (eBioscience, Cat n.º: 00-4201-56) y la placa se incubó durante 3 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 µl/pocillo de solución de parada (2N H₂SO₄) para detener la reacción. Se revelaron las señales colorimétricas y se leyeron a 450 nm usando un Auto Plate SpectraMax Plus (proveedor: Molecular Devices; modelo: MNR0643; programa informático: SoftMax Pro v5.4). Los datos se analizaron usando GraphPad Prism 5 y se calculó la CI50 (**figuras 4-6; tablas 8-10**). Estos datos demostraron que los anticuerpos anti-PD-L1 (de hibridoma, quiméricos y humanizados) pueden bloquear la unión de PD-1 con PD-L1 en la superficie celular, medidos por ELISA.

Tabla 8. CI50 de anticuerpo monoclonal de hibridoma anti-PD-L1 que inhibe la unión de PD-1 con PD-L1 sobre superficie sólida

Ab de hibridoma	m5G11	m7B4	m4D1	m8H4	m13C5	m8C6	m5G9	m4A8	m8H3	m15F1
CI50 (ng/ml)	710,2	892,0	332,2	787,8	871,7	343,7	613,2	867,8	647,4	655,3

5 Tabla 9. CI50 de anticuerpo quimérico anti-PD-L1 que inhibe la unión de PD-1 con PD-L1 sobre superficie sólida

Ab quimérico	ch5G11 hlgG1	ch5G11 hlgG4	ch8C6 hlgG4	ch8H4 hlgG4	ch13C5 hlgG1	ch13C5 hlgG4
CI50 (ng/ml)	1006	926,1	476,6	848,1	805,2	375,3

10 Tabla 10. CI50 de anticuerpo humanizado anti-PD-L1 que inhibe la unión de PD-1 con PD-L1 sobre superficie sólida

Ab humanizado	hu5G11 hlgG1	hu5G11 hlgG4	hu13C5 hlgG1	hu13C5 hlgG4
CI50 (ng/ml)	793,6	822,5	1202,6	1192,4

Ejemplo 4: Análisis de unión basado en células de anticuerpos anti-PD-L1

15 Se realizaron análisis de unión celular de anticuerpos anti-PD-L1 basados en la unión a una línea celular 293T que expresaba de forma estable PD-L1 (PD-L1-293T). Se añadieron 2×10^5 células 293T-PD-L1 a cada pocillo de placas de cultivo de 96 pocillos y se incubaron con el anticuerpo indicado (20 µg/ml con la dilución de 1:5) a 4 °C durante 1 h. Después de que las células se lavaran tres veces con tampón FACS, el anticuerpo secundario (PE-de cabra antirrón: 1:200; PE-de ratón antihumano: 1:10) se añadió a las células a 100 µl/pocillo, y se incubaron a 4 °C durante 20 40 min. Las células se lavaron tres veces con tampón FACS y se analizaron mediante matriz FACS. La unión de los anticuerpos de hibridoma se muestra en la **figura 7a y 7b**. La unión de anticuerpos quiméricos se muestra en la **figura 8**. La unión de anticuerpos humanizados se muestra en la **figura 9**. La CE50 calculada para anticuerpos de hibridoma, quiméricos y humanizados se muestra a continuación en las **tablas 11, 12, y 13**, respectivamente. Estos datos demostraron que los anticuerpos anti-PD-L1 (de hibridoma, quiméricos y humanizados) se unen a PD-L1, medidos por análisis FACS.

Tabla 11. CE50 de anticuerpo monoclonal de hibridoma anti-PD-L1 con PD-L1 sobre superficie celular

Ab de hibridoma	m4D1	m4A8	m5G11	m8H4	m8H3
CE50 ng/ml	36,07	67,83	35,94	43,49	50,81
Ab de hibridoma	m8C6	m9G9	m7B4	m13C5	m15F1
CE50 ng/ml	40,97	33,7	47,41	45,29	47,8

30 Tabla 12. CE50 de anticuerpo quimérico anti-PD-L1 con PD-L1 sobre superficie celular

Ab quimérico	ch13C5 hlgG1	ch5G11 hlgG1	ch5G11 hlgG4
CE50 ng/ml	75,75	58,26	89,68

Tabla 13. CE50 de anticuerpo humanizado anti-PD-L1 con PD-L1 sobre superficie celular

Ab humanizado	hu5G11 hlgG1	hu5G11 hlgG4	hu13C5 hlgG1	hu13C5 hlgG4
CE50 ng/ml	47,93	54,33	80,01	80,39

35 También se investigó el efecto del anticuerpo anti-PD-L1 sobre la unión de PD-1 a PD-L1 en la superficie celular. En resumen, se suspendieron células PD-L1-293T en tampón FACS (PBS con un 3 % de suero fetal de ternera). Se añadieron diversas concentraciones de los anticuerpos anti-PD-L1 de hibridoma (**figura 10**), quiméricos (**figura 11**) o humanizados (**figura 12**) a la suspensión celular y se incubaron a 4 °C durante 60 minutos en placas de 96 pocillos. Después se añadió la proteína PD-L1 marcada con biotina a los pocillos y se incubó a 4 °C durante 60 minutos. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con anticuerpo de ratón antibiotina marcado con PE (Biolegend,

cat n.º 409004). La fluorescencia asociada a las células entonces se detectó por análisis de citometría de flujo usando matriz FACS. Se midieron los efectos de los anticuerpos anti-PD-L1 sobre la unión de PD-1 con PD-L1-293T mediante la intensidad media fluorescente (MFI) de la tinción. La inhibición de la unión de PD-1 por anticuerpo anti-PD-L1 de hibridoma se muestra en las **figuras 10a y 10b**. La inhibición de la unión de PD-1 por anticuerpos quiméricos anti-PD-L1 se muestra en la **figura 11**. La inhibición de la unión de PD-1 por anticuerpos humanizados anti-PD-L1 se muestra en la **figura 12**. La CI50 calculada para los anticuerpos de hibridoma (**tabla 14**), quiméricos (**tabla 15**) y humanizados (**tabla 16**) se muestra en las tablas a continuación. Estos datos demostraron que los anticuerpos anti-PD-L1 (de hibridoma, quiméricos y humanizados) pueden bloquear la unión de PD-1 con PD-L1 en la superficie celular, medidos por análisis FACS.

Tabla 14. CI50 de anticuerpo monoclonal de hibridoma anti-PD-L1 que inhibe la unión de PD-1 con PD-L1 sobre superficie celular

Ab de hibridoma	mIgG1	m4D1	m5G11	m13C5	m7B4	m8H4
CI50 ng/ml	NA	27,3	16,3	28,9	38,1	30. 6
Ab de hibridoma	m4A8	m5G9	m8C6	m8H3	m15F1	
CI50 ng/ml	29,1	49,1	8,2	33,6	21,1	

Tabla 15. CI50 de anticuerpo quimérico anti-PD-L1 que inhibe la unión de PD-1 con PD-L1 sobre superficie celular

Ab quimérico	ch5G11 hlgG1	ch5G11 hlgG4	ch8C6 hlgG4	ch8H4 hlgG4	ch13C5 hlgG1	ch13C5 hlgG4
CI50 ng/ml	40,36	33,18	34,91	42,02	42,71	35,78

Tabla 16. CI50 de anticuerpo humanizado anti-PD-L1 que inhibe la unión de PD-1 con PD-L1 sobre superficie celular

Ab humanizado	hlgG4	hu13C5 hlgG1	hu13C5 hlgG4	hu5G11 hlgG1	hu5G11 hlgG4
CI50 ng/ml	NA	18,5	49,9	16,5	9,6

Ejemplo 5: Efecto de los anticuerpos anti-PD-L1 sobre la activación de linfocitos T en una reacción de linfocitos mixtos

Se empleó una reacción de linfocitos mixtos para demostrar el efecto de anticuerpos murinos (**figura 13a, 13b**), quiméricos (**figura 14a, 14b**) o humanizados (**figura 15a, 15b**) anti-PD-L1 en el bloqueo de la ruta de PD-L1/PD-1 en células efectoras que son linfocitos. Los linfocitos T en el ensayo se ensayaron para la secreción de IFN- γ e IL-2 en presencia o ausencia de anticuerpo humanizado anti-PD-L1.

Se purificaron linfocitos T CD4⁺ humanos de PBMC humanos usando un kit de aislamiento de selección negativa de CD4⁺ (Mitenyi Biotech, cat n.º 130-091-155). Se obtuvieron células dendríticas (DC) inmaduras de monocitos aislados de PBMC humanos usando la Mo-DC Generation Toolbox (Mitenyi, Cat n.º 130-093-568). Las células se cultivaron con medio de diferenciación Mo-DC durante 7 días, y después se indujeron para que fueran DC maduras con medio de maduración Mo-Dc durante 2 días. Para establecer la MLR, para cada reacción, se añadieron 10⁵ linfocitos T purificados y 10⁴ células DC maduras alogénicas en un volumen total de 200 μ l. El anticuerpo de ensayo se ensayó a diferentes concentraciones como se muestra en las **figuras 13a, 13b, 14a, 14b, 15a y 15b** (es decir, 20 μ g/ml, 2 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 0,02 μ g/ml y 0,002 μ g/ml). Se usó ausencia de anticuerpo o un anticuerpo de control de isotipo como control negativo. Las células se cultivaron durante 5 días a 37 °C. En el 6.º día, los niveles de IFN- γ e IL-2 en el medio de cultivo se midieron usando el kit ELISA de IL-2 (eBioscience) y el kit ELISA de hIFN- γ (R&D, cat n.º DY285). Los resultados se muestran en las **figuras 13a, 14a y 15a** para la secreción de IL-2, y las **figuras 13b, 14b y 15b** para la secreción de IFN- γ . Los resultados del estudio mostraron que los anticuerpos anti-PD-L1 de hibridoma, quiméricos y humanizados promovían la secreción de IFN- γ e IL-2 de linfocitos T de una manera dependiente de la concentración. En contraste, los cultivos que contenían el anticuerpo de control de isotipo no mostraron aumento en la secreción de IFN- γ e IL-2.

Ejemplo 6: Efecto del anticuerpo anti-PD-L1 sobre la función de linfocitos T reguladores

Los linfocitos T reguladores (CD4⁺, CD25⁺) son linfocitos que suprimen la respuesta inmunitaria. Se ensayó el efecto de los linfocitos T reguladores sobre la secreción de citocinas de linfocitos T efectoras en MLR en presencia o ausencia

de anticuerpos anti-PD-L1 quiméricos o humanizados. Se purificaron linfocitos T reguladores (CD4⁺ CD25⁺) de PBMC usando un kit de aislamiento de linfocitos T reguladores (Miltenyi Biotec, cat n.º 130-091-301). Se obtuvieron células dendríticas (DC) inmaduras de monocitos aislados de PBMC humanos usando la Mo-DC Generation Toolbox (Miltenyi, cat n.º 130-093-568). Las células se cultivaron con medio de diferenciación Mo-DC durante 7 días, y después se indujeron para que fueran DC maduras con medio de maduración Mo-Dc durante 2 días. Los linfocitos T reguladores se añadieron en una reacción de linfocitos mixtos que contenía linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ purificados y células dendríticas alogénicas en una relación 4:1 de células CD4⁺ CD25⁻ a linfocitos T reguladores. Por ejemplo: a la reacción se le añadieron 1×10⁵ células/pocillo de células CD4⁺CD25⁻, 1×10⁴ células/pocillo de mDC y 0,25×10⁵ células/pocillo de células CD4⁺CD25⁺. El anticuerpo se añadió a cada reacción a una concentración de 10 µg/ml. Se usó ausencia de anticuerpo o un anticuerpo de control de isotipo como control negativo. Las células se cultivaron durante 5 días a 37 °C. En el 5.º día, se tomaron 50 µl de medio para detectar la concentración de IL-2 e IFN-gamma. Después de complementar cada pocillo con 50 µl de medio de cultivo, las células se cultivaron durante otros 2 días antes de analizarse para la proliferación celular por CTG (Promega, G7573). Los niveles de IFN-γ e IL-2 en el medio de cultivo se midieron usando un kit ELISA de hIFN-γ (R&D, cat n.º DY285) y kit ELISA de IL-2 (eBioscience). Como se muestra en la **figura 16**, anticuerpos quiméricos y humanizados anti-PD-L1, ch-13C5-hlgG1, ch-13C5-hlgG4, hu-13C5-IgG1, hu-13C5-IgG4, ch-5G11-IgG1, ch-5G11-IgG4, hu-5G11-IgG1 y hu-5G11-IgG4, pueden reducir el efecto inhibitorio de los linfocitos Treg sobre la secreción de IFN-γ por linfocitos T efectoros CD4⁺CD25⁻, lo que sugiere que los anti-PD-L1 pueden modular la función inmunosupresora de los linfocitos T reguladores.

Ejemplo 7: Efecto del anticuerpo humanizado anti-PD-L1 sobre la activación de linfocitos T autólogos

En este ejemplo, se examinó el efecto de bloquear la ruta de PD-1/PD-L1 por el anticuerpo anti-PD-L1 sobre la activación de linfocitos T. Se activaron linfocitos T CD4⁺ humanos purificados (Miltenyi Biotec, cat n.º 130-091-155) con 1 µg/ml de anticuerpo soluble anti-CD3 (R&D, cat n.º MAB100) en presencia de células dendríticas (DC) autólogas derivadas de monocitos. Después de tres días de activación en presencia o ausencia de anticuerpo anti-PD-L1 valorado, se recogió el medio de cultivo y se midió la concentración de IFNγ con ELISA. Los resultados se muestran en la **figura 17** y sugieren que el bloqueo de PD-L1 por anticuerpos humanizados anti-PD-L1 potenciaba la secreción de IFN-γ por linfocitos T.

Ejemplo 8: La respuesta de linfocitos T humanos evocados a exposición a toxoide tetánico se potencia por el anticuerpo humanizado anti-PD-L1

Para investigar si la activación del receptor de linfocitos T específicos de antígeno se modulaba bloqueando la ruta de PD-1/PD-L1 con anticuerpos anti-PD-L1, se empleó el ensayo de evocación de linfocitos T humanos usando antígeno de toxoide tetánico (TT) para estimular linfocitos T de memoria preexistentes en la sangre de donadores inmunizados con TT sanos. Para este fin, se sembraron PBMC frescos de donadores inmunizados con TT recientemente [<1 año] en placas de fondo redondo de 96 pocillos (costar, cat n.º 3799) a 4 × 10⁵ células/pocillo usando RPMI1640 (Invitrogen, cat n.º A10491-01) complementado con 80 U/ml de penicilina, 80 g/ml de estreptomycin y un 30 % de suero autólogo, con adición de 5G11 o 13C5 humanizado a diversas concentraciones, y se estimularon con 0,1 µg/ml de SEB y 1 µg/ml de TT (Astarte Biologies). Después de cocultivo durante 7 días a 37 °C, un 5 % de CO₂, el sobrenadante se recogió y se midió la concentración de IFN-γ. Las **figuras 18a y 18b** proporcionan los resultados del ensayo usando PBMC de dos donadores separados. Los resultados del estudio demuestran que, en comparación con el antígeno TT en solitario, el bloqueo de PD-L1 con anticuerpo anti-PD-L1 provocaba secreción potenciada de IFN-γ por linfocitos T de memoria.

En resumen, el anticuerpo humanizado 5G11 y 13C5 conservaba la actividad funcional de sus anticuerpos precursores durante el proceso de humanización.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une a PD-L1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.
- 10 2. El anticuerpo aislado o fragmento del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un scFv, un fragmento Fab, un fragmento Fab' y un fragmento F(ab)'.
3. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se liga o conjuga con un agente terapéutico, preferiblemente en donde el agente terapéutico es un fármaco citotóxico, un isótopo radiactivo, un inmunomodulador o un anticuerpo.
- 15 4. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 20 6. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.
- 25 8. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso como medicamento.
9. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en el tratamiento de un cáncer o una enfermedad infecciosa en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el
- 30 método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado o fragmento del mismo al sujeto, preferiblemente en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma, leucemia, melanoma, glioma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de hueso, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer rectal, cáncer testicular, cáncer salival, cáncer de tiroides, cáncer tímico, cáncer epitelial, cáncer de cabeza o cuello, cáncer gástrico, cáncer pancreático o una combinación de los
- 35 mismos; o en donde la enfermedad infecciosa se selecciona del grupo que consiste en candidiasis, candidemia, aspergilosis, neumonía estreptocócica, afecciones estreptocócicas de la piel y orofaríngeas, septicemia gramnegativa, tuberculosis, mononucleosis, gripe, enfermedad respiratoria provocada por el virus sincitial respiratorio, paludismo, esquistosomosis y tripanosomosis.

Figura 1

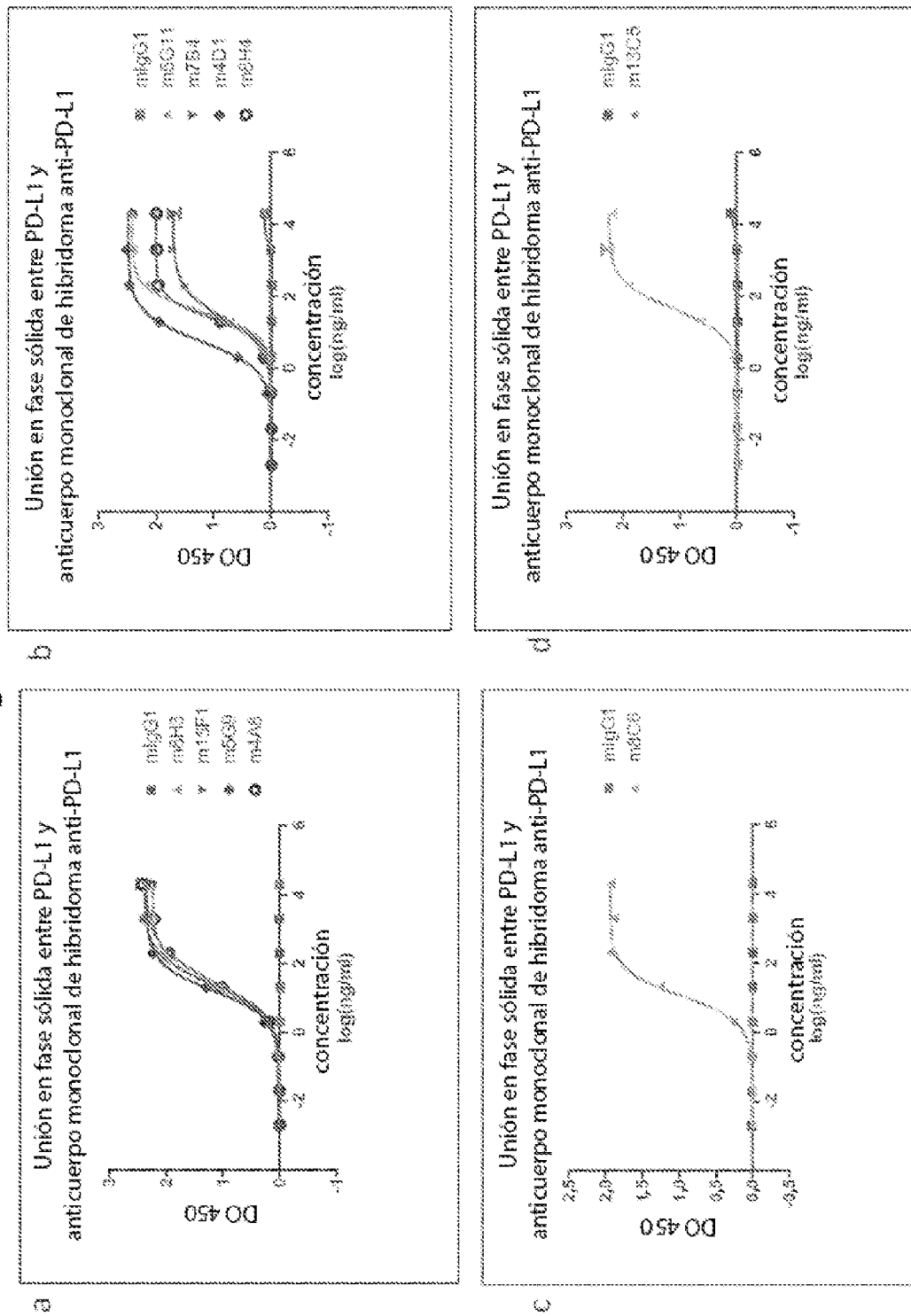


Figura 2

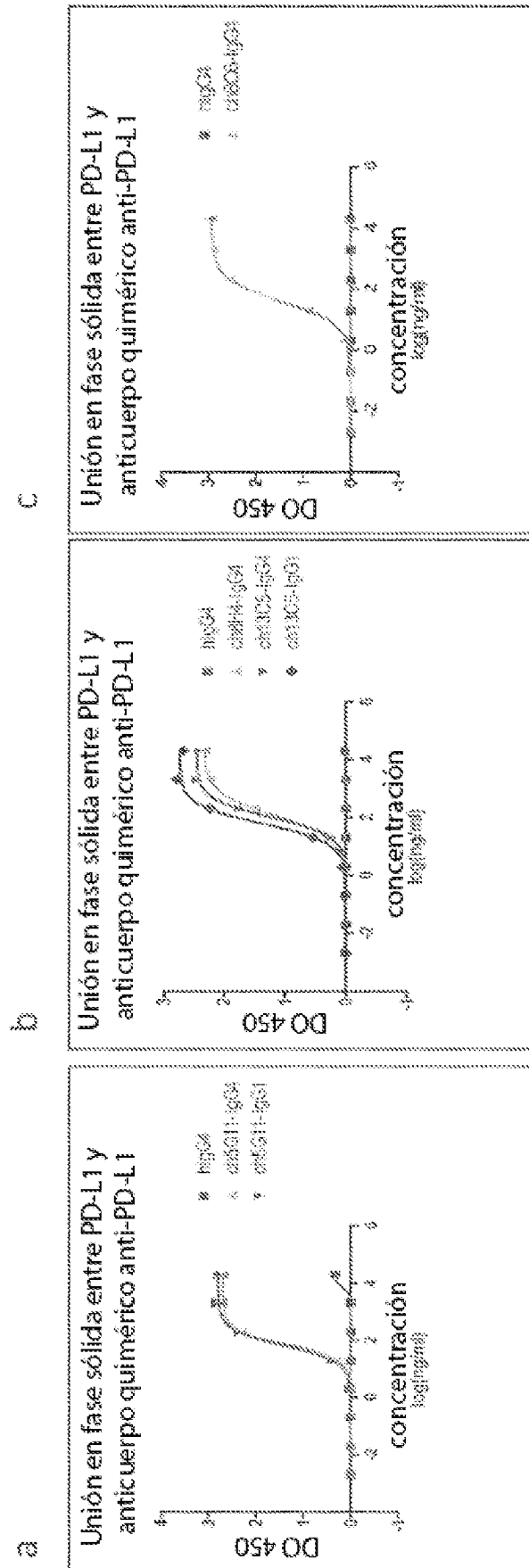
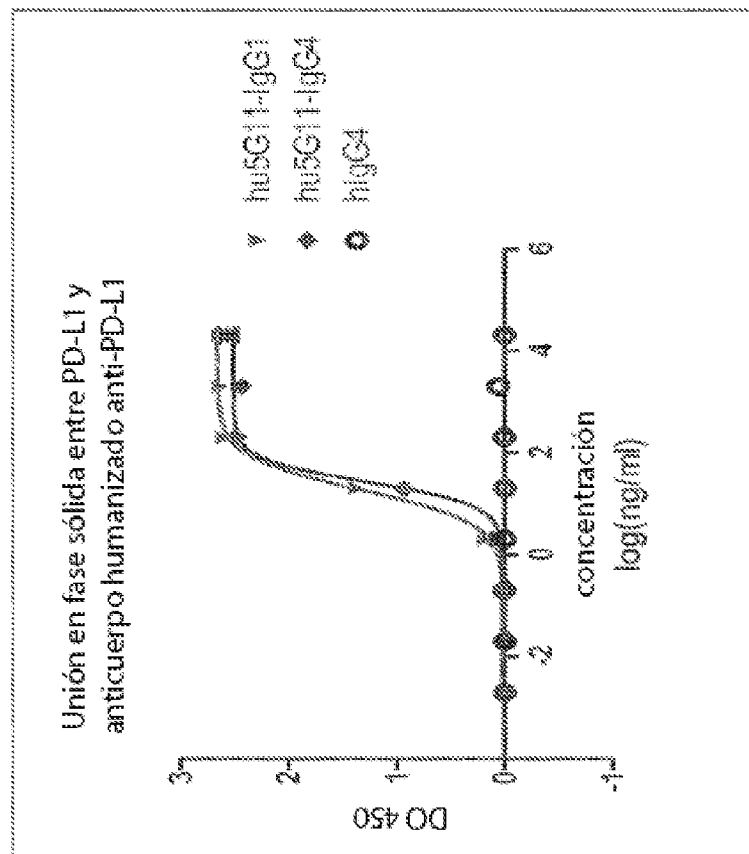


Figura 3

a



b

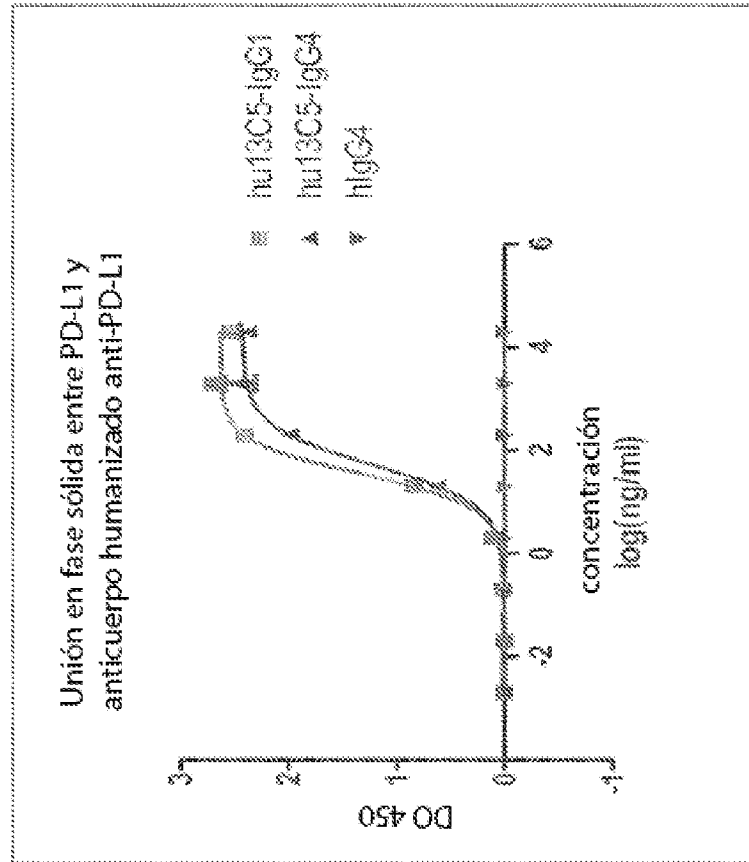


Figura 4

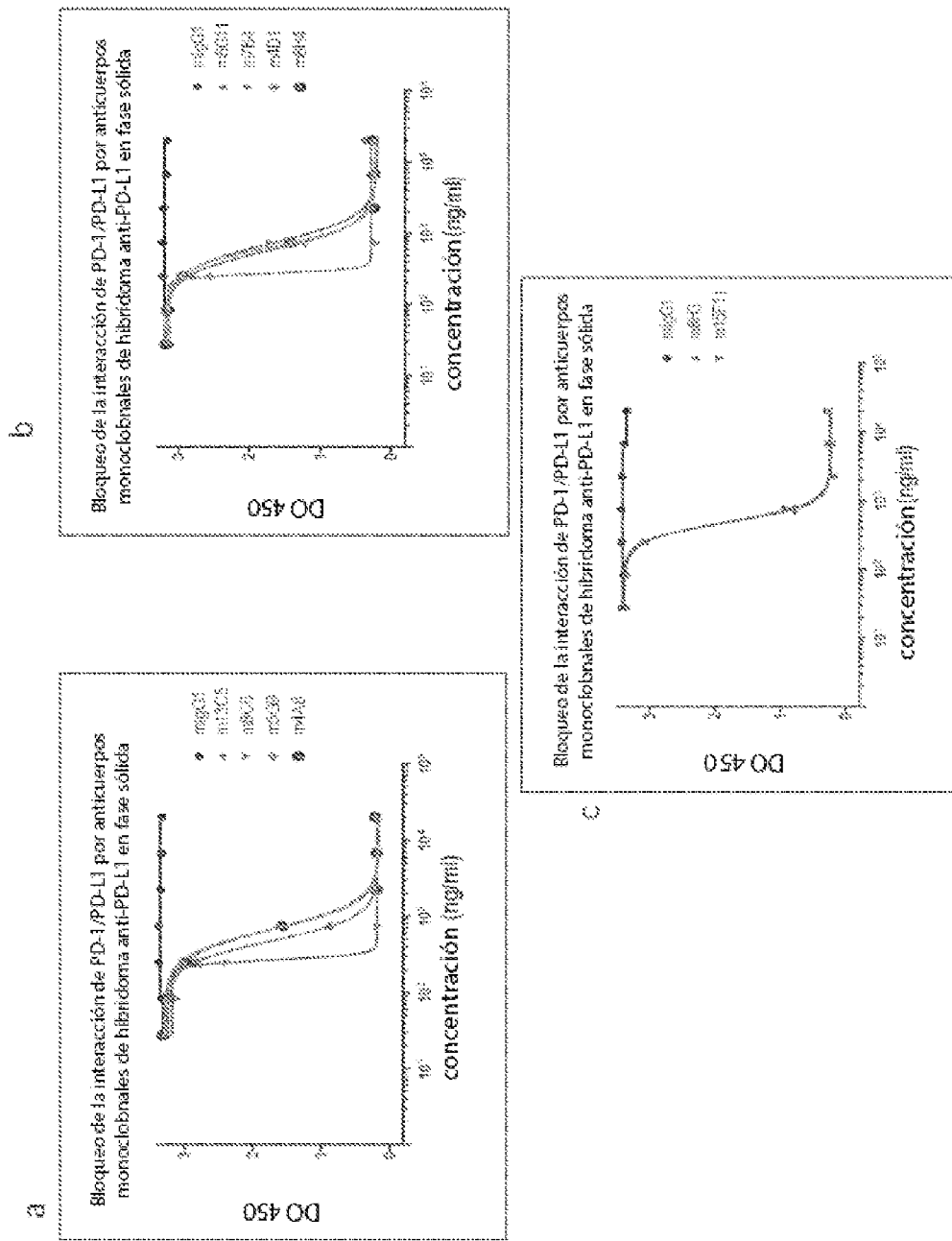


Figura 5

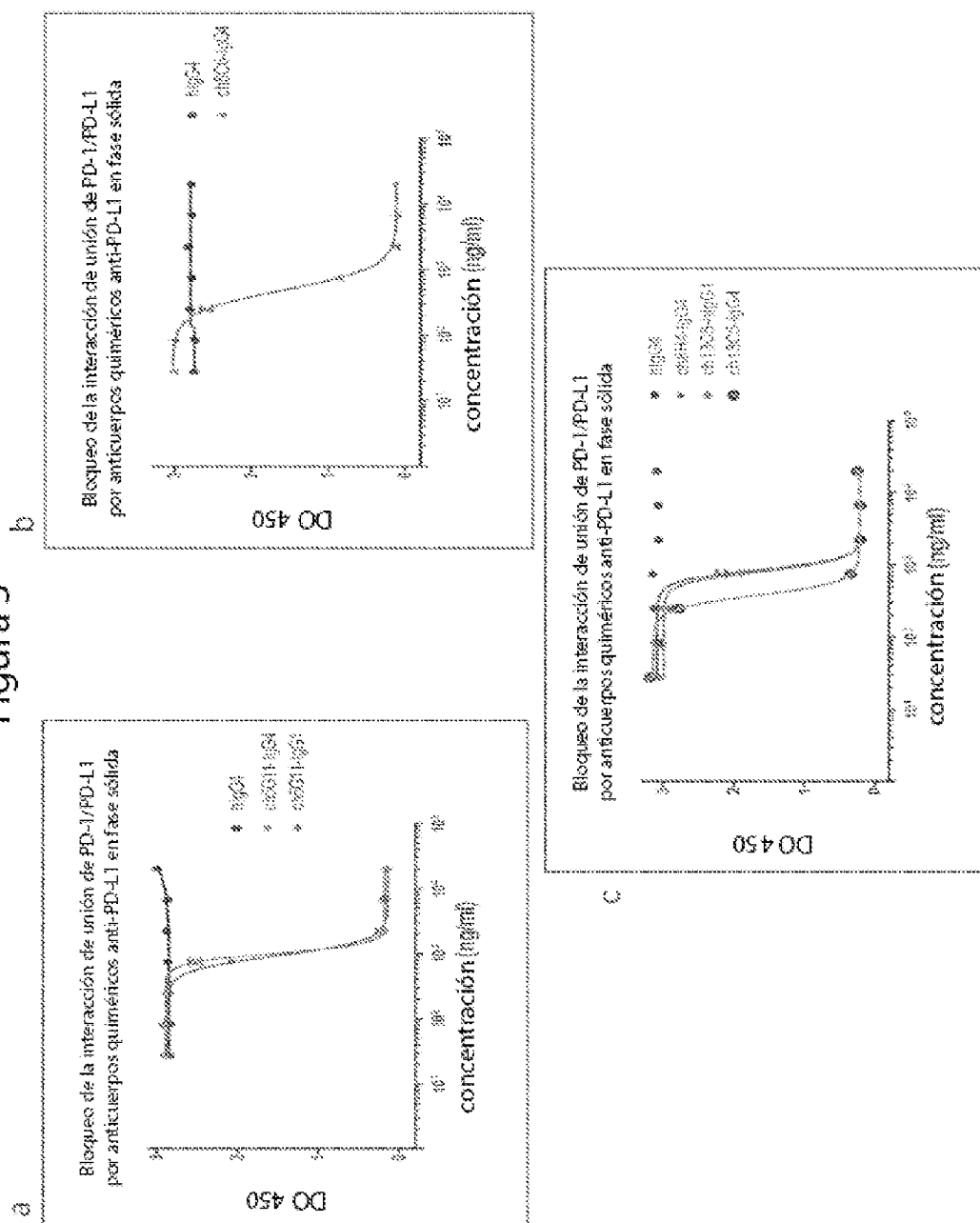
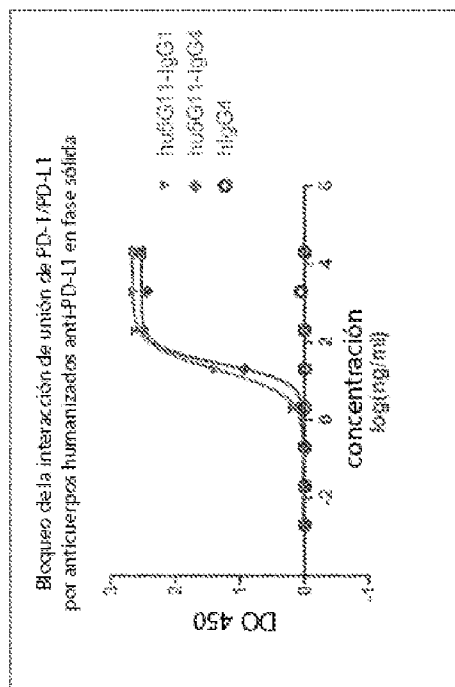
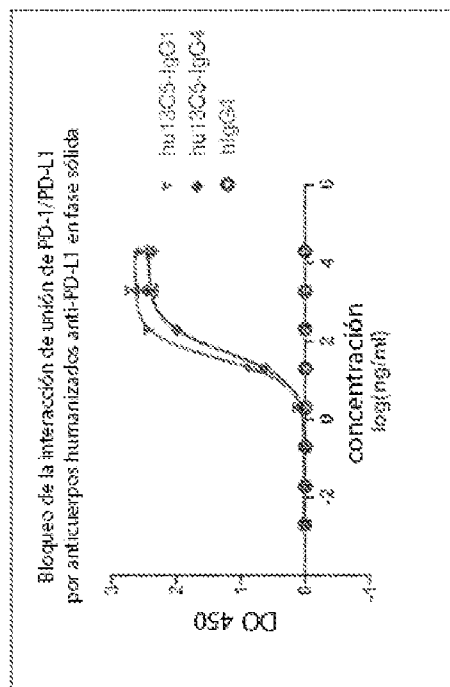


Figura 6



2

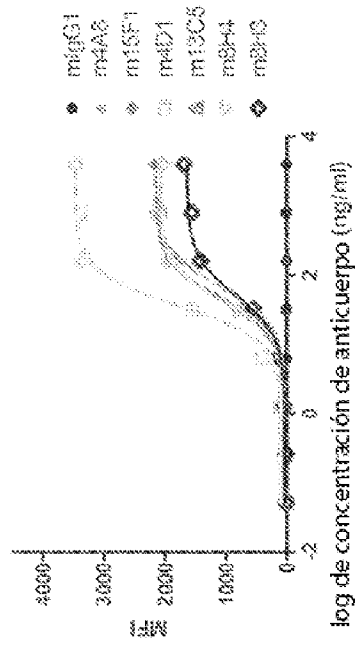


3

Figura 7

a

Interacción de unión entre anticuerpo monoclonal de
hibridoma anti-PD-L1 y PD-L1 en la superficie celular



b

Interacción de unión entre anticuerpo monoclonal de
hibridoma anti-PD-L1 y PD-L1 en la superficie celular

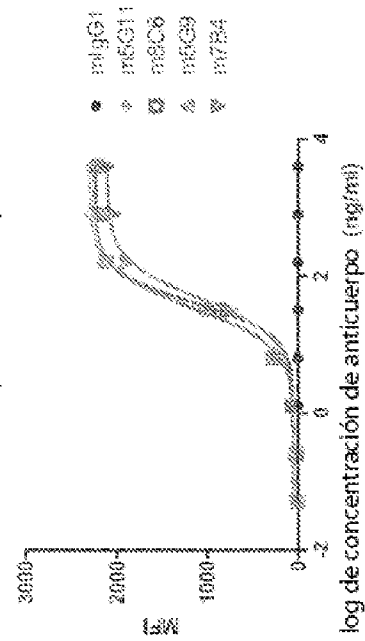


Figura 8

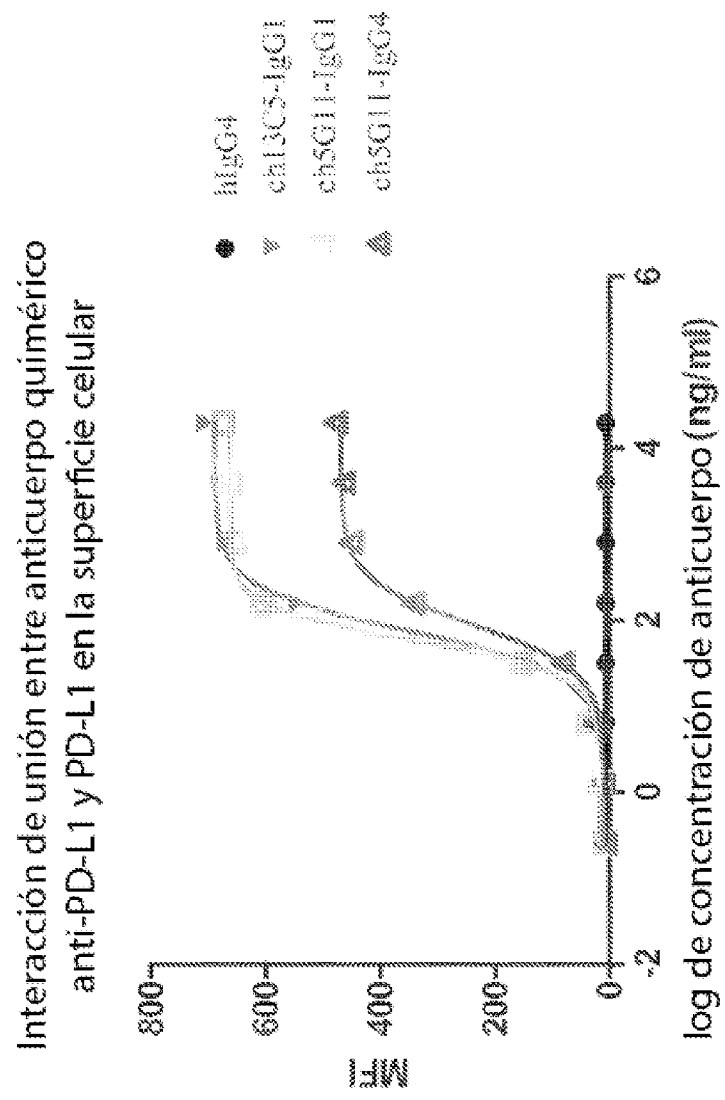


Figura 9

Interacción de unión entre anticuerpo humanizado anti-PD-L1 y PD-L1 en la superficie celular

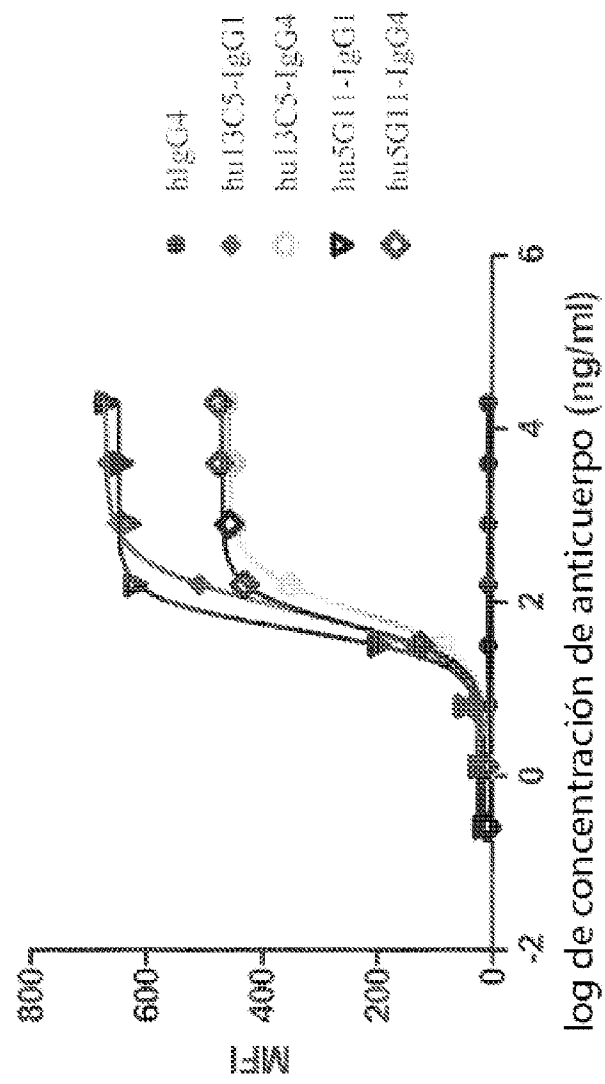


Figura 10

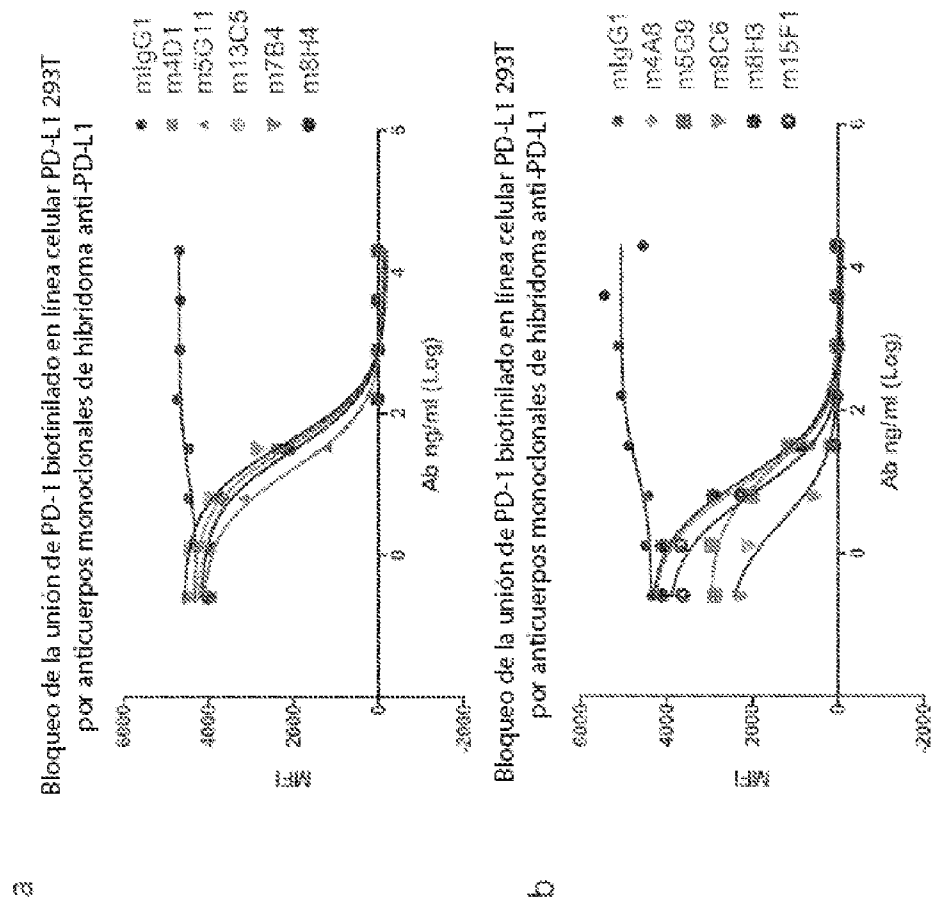


Figura 11

Bloqueo de la unión de PD-1 biotinilado en línea celular PD-L1 293T
por anticuerpos quiméricos anti-PD-L1

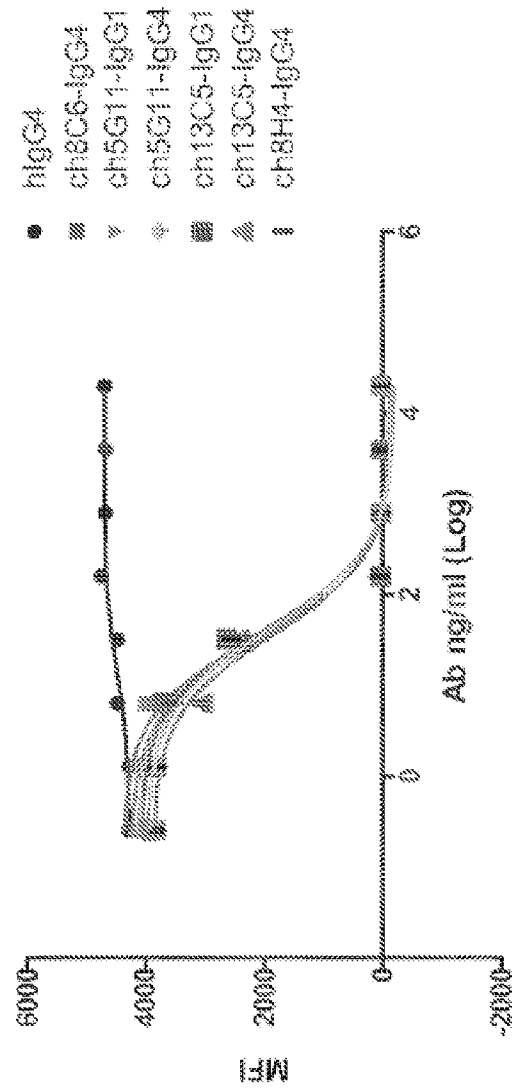


Figura 12

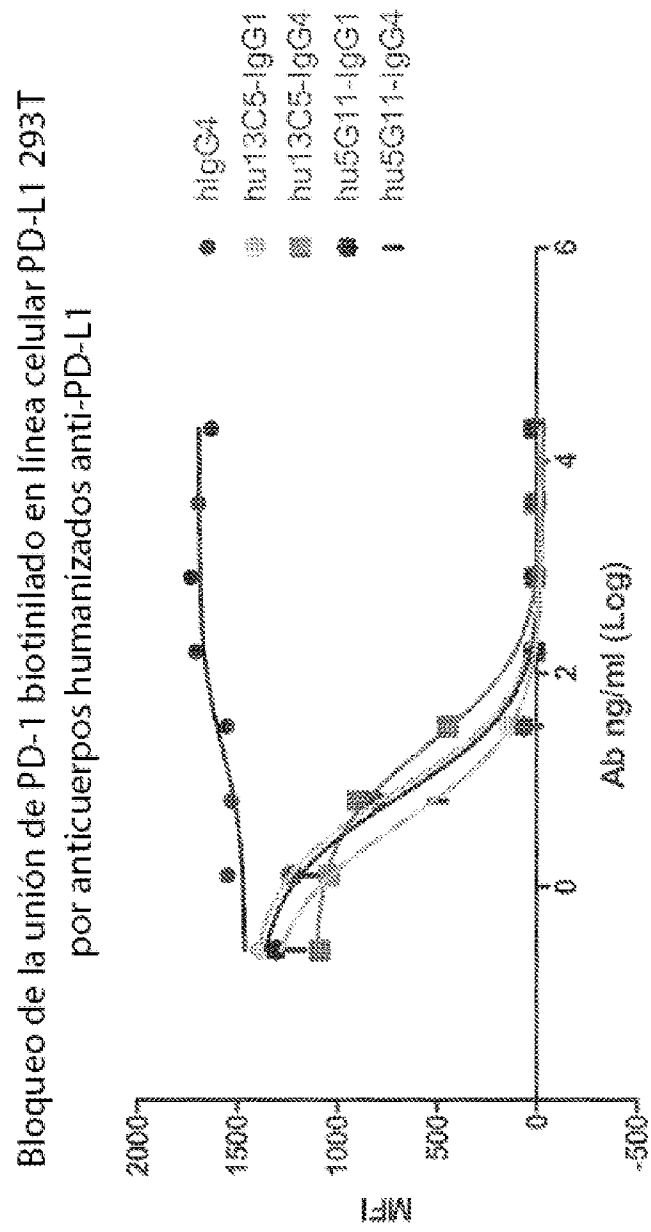


Figura 13a

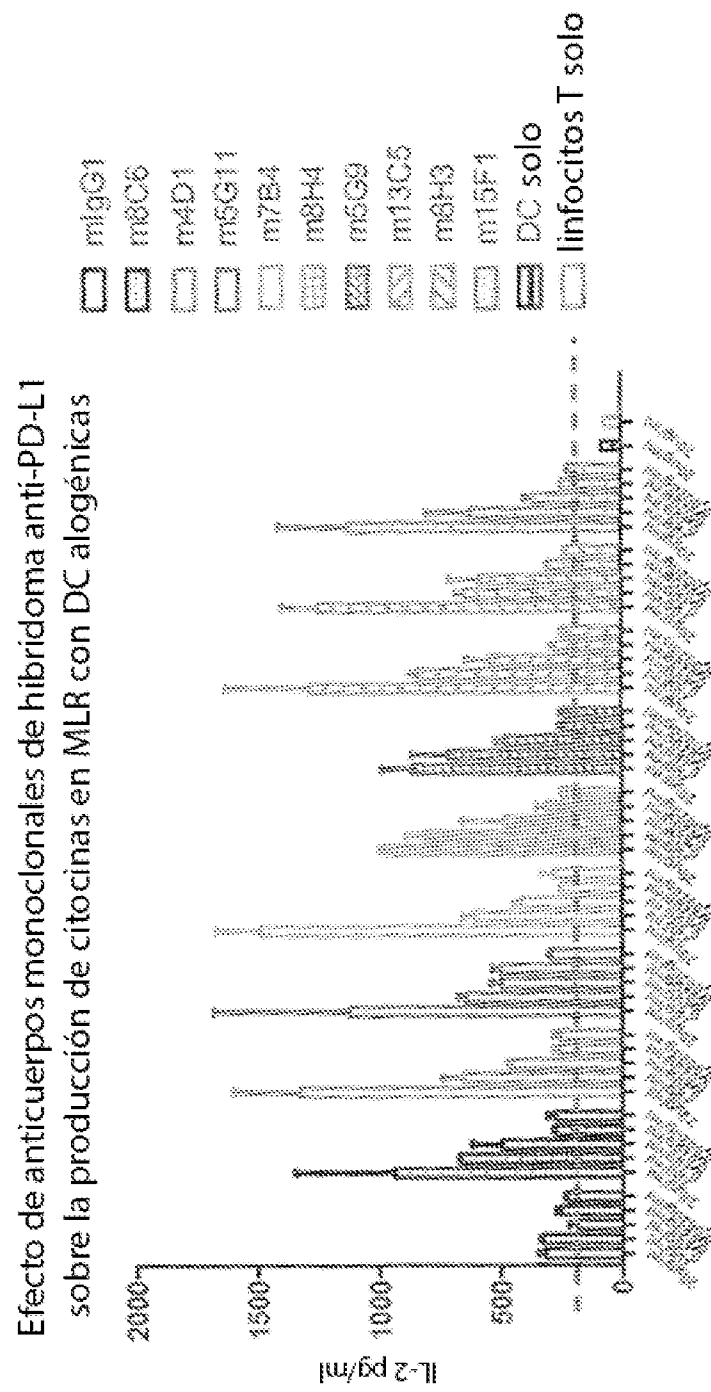


Figura 13b

Efecto de anticuerpos monoclonales de hibridoma anti-PD-L1 sobre la producción de citocinas en MLR con DC alogénicas

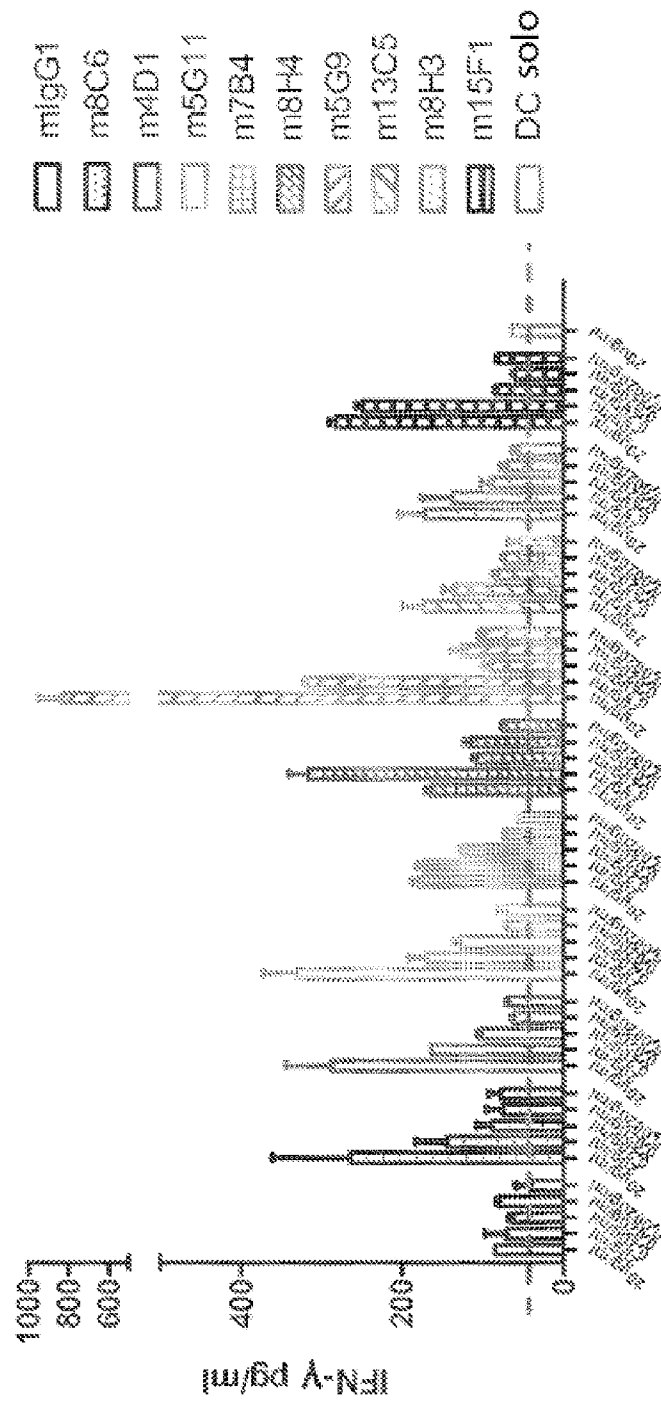
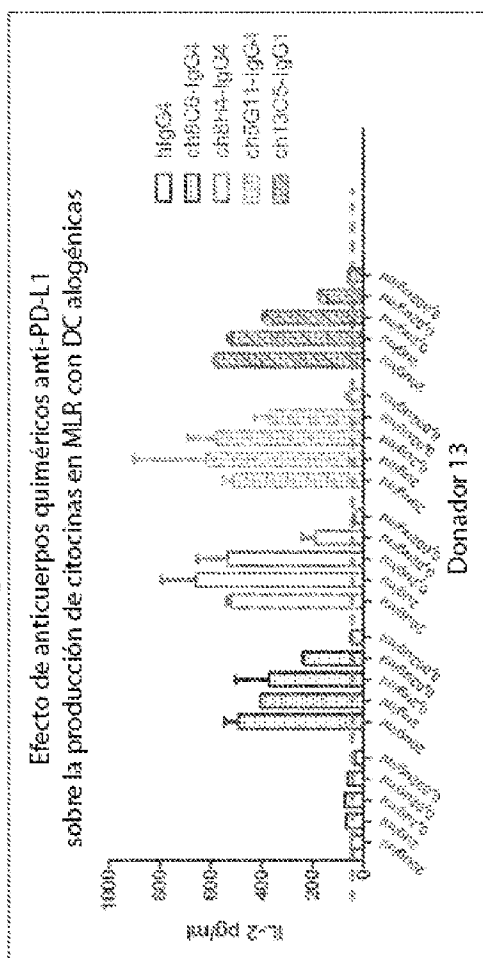
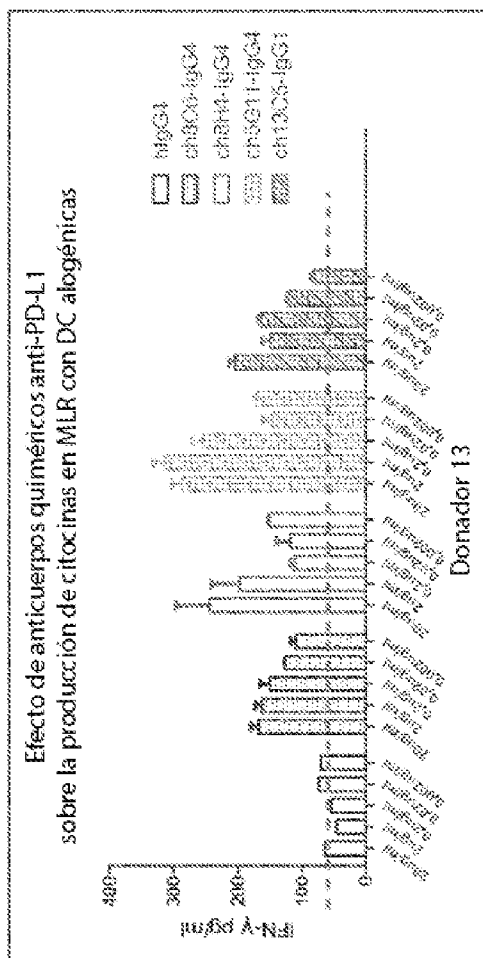


Figura 14



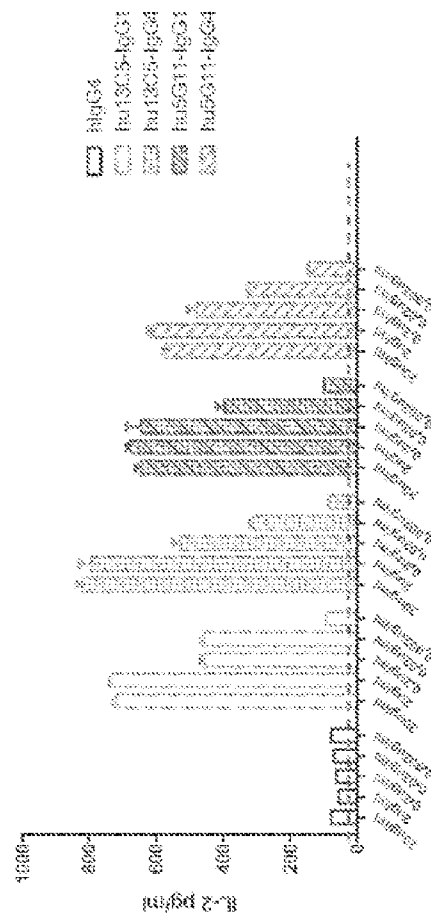
a



b

Figura 15

Efecto de anticuerpos humanizados anti-PD-L1 sobre la producción de citocinas en MLR con DC alógenas



Efecto de anticuerpos humanizados anti-PD-L1 sobre la producción de citocinas en MLR con DC alógenas

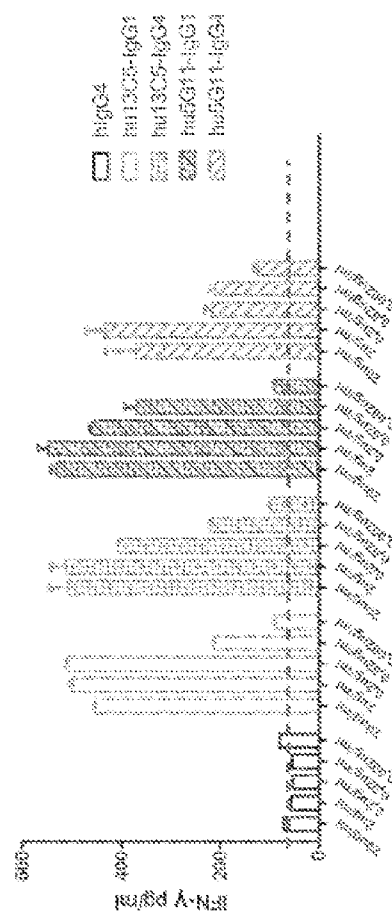


Figura 16

Linfocitos Treg sobre la secreción de citocinas en MLR alógena
de linfocitos T CD4+CD25- y células dendríticas

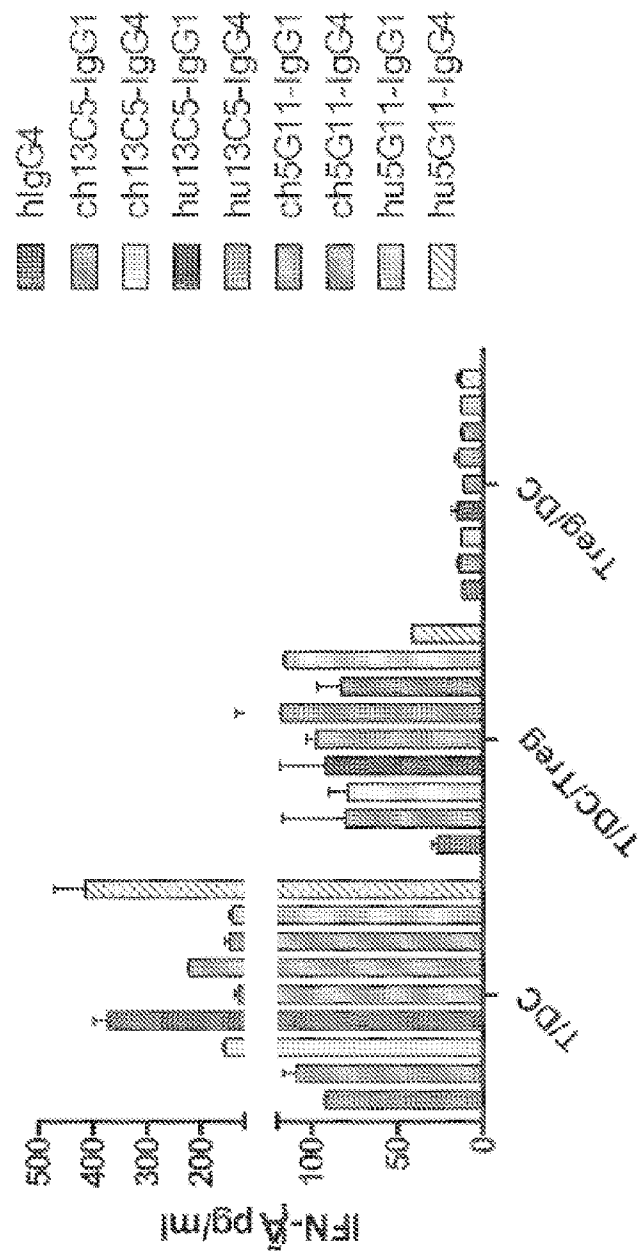


Figura 17

Efecto de anticuerpos humanizados anti-PD-L1 sobre la producción de citocinas coestimulada con DC autólogas y anticuerpo anti-CD3

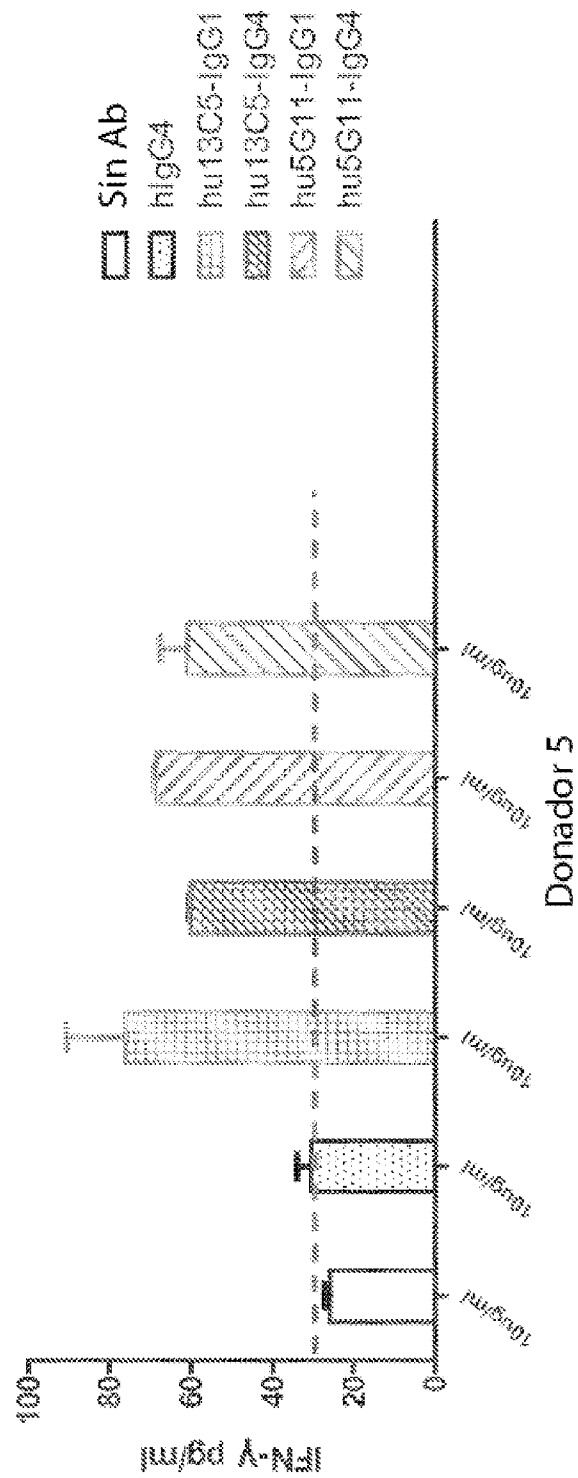


Figura 18

