(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 983 922**

(51) Int. CI.:

C07K 16/10 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2018 PCT/EP2018/055977**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2018 WO18162749**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2018 E 18712124 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2024 EP 3592769**

(54) Título: **Anticuerpos contra PD-L1**

(30) Prioridad:

09.03.2017 DK PA201700164
11.07.2017 DK PA201700408

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2024

(73) Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)
Carl Jacobsens Vej 30
2500 Valby, DK

(72) Inventor/es:

ALTINTAS, ISIL;
SATIJN, DAVID;
VAN DEN BRINK, EDWARD;
VERZIJL, DENNIS;
RADEMAKER, RIK;
PARREN, PAUL y
DE GOEIJ, BART

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

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 contra PD-L1

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos y su uso en medicina. En particular, la invención se refiere a anticuerpos biespecíficos capaces de unirse a PD-L1 humano y capaces de unirse a CD3 humano. También se proporcionan nuevas clases de anticuerpos capaces de unirse a PD-L1 humano. La invención se refiere además a usos de los anticuerpos de la invención y a métodos, construcciones de ácidos nucleicos y células huésped para producir anticuerpos de la invención.

Antecedentes de la invención

El ligando de muerte programada 1 (PD-L1, PDL1, CD274, B7H1, B7-H1) es una proteína de membrana de tipo I de paso único de 33 kDa. Se han descrito tres isoformas de PD-L1, basadas en empalme alternativo. PD-L1 pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) y contiene un dominio tipo C2 similar a Ig y un dominio tipo V similar a Ig. Las células T y B recién aisladas expresan cantidades insignificantes de PD-L1 y una fracción (aproximadamente 16 %) de monocitos CD14+ expresan constitutivamente PD-L1 (Rietz y Chen, 2004 Am J Transplant 4: 8-14). Se sabe que el interferón-γ (IFN-γ) sobrerregula PD-L1 en células tumorales (Abiko et al., 2015 Br J Cancer 112:1501-1509; Dong et al., 2002 Nature Medicine 8(8): 793-800).

PD-L1 obstruye la inmunidad antitumoral al 1) tolerar las células T reactivas a tumores mediante la unión a su receptor PD-1 (CD279) en células T activadas (Dong et al., citado más arriba; Latchman et al., 2004 Proc. Natl Acad Sci USA 101, 10691-6); 2) hacer que las células tumorales sean resistentes a la lisis mediada por células T CD8+ y ligando Fas mediante señalización de PD-1 a través de PD-L1 expresado en células tumorales (Azuma et al., 2008 Blood 111, 3635-43); 3) tolerar las células T mediante señalización inversa a través de CD80 (B7.1) expresado en células T (Butte et al., 2007 Immunity 27, 111-22; Park et al., 2010 Blood 116, 1291-8); y 4) promover el desarrollo y mantenimiento de células T reguladoras inducidas (Francisco et al., 2009 J Exp Med 206, 3015-29). PD-L1 se expresa en muchos cánceres humanos, incluido el melanoma, el cáncer de ovario, de pulmón y de colon (Dong et al., citado más arriba).

Los anticuerpos bloqueantes de PD-L1 han mostrado actividad clínica en varios cánceres que se sabe que sobreexpresan PD-L1 (incluido melanoma, NSCLC). Por ejemplo, atezolizumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado contra PD-L1. Actualmente se encuentra en ensayos clínicos como inmunoterapia para varias indicaciones, incluidos varios tipos de tumores sólidos (ver, por ejemplo, Rittmeyer et al., 2017 Lancet 389: 255-265). Avelumab, un anticuerpo PD-L1 (Kaufman et al Lancet Oncol. 2016; 17(10):1374-1385) ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes adultos y pediátricos de 12 años o más con carcinoma de células de Merkel metastásico, y actualmente se encuentra en ensayos clínicos en varias indicaciones de cáncer, incluido el cáncer de vejiga, el cáncer gástrico, el cáncer de cabeza y cuello, el mesotelioma, el NSCLC, el cáncer de ovario y el cáncer renal. Durvalumab, un anticuerpo PD-L1, está aprobado para indicaciones de carcinoma urotelial localmente avanzado o metastásico, y está en desarrollo clínico en múltiples tumores sólidos y cánceres de la sangre (ver, por ejemplo, Massard et al., 2016 J Clin Oncol. 34(26):3119 -25). Se han descrito más anticuerpos anti-PD-L1 en los documentos WO2004004771, WO2007005874, WO2010036959, WO2010077634, WO2013079174, WO2013164694, WO2013173223 y WO2014022758.

Aunque se han logrado avances significativos en la erradicación del cáncer, todavía existe la necesidad de mejorar aún más la terapia contra el cáncer basada en anticuerpos.

El documento US 8 779 108 B2 se refiere a anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra B7-H1 y usos de estos anticuerpos en el diagnóstico y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad y/o expresión de B7-H1. Además, se describen hibridomas u otras líneas celulares que expresan dichos anticuerpos.

ULRICH STORZ "Intellectual property issues of immune checkpoint inhibitors" [MABS, vol. 8, núm. 1, 14 de octubre de 2015 (2015-10-14), páginas 10-26, XP055454739, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2015.1107688] se relaciona con el campo de las patentes y analiza los actores clave y los casos relacionados con los inhibidores de puntos de control inmunológico.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona nuevos anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22. Los anticuerpos de este segundo aspecto de la invención pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos y, si son multiespecíficos, dichos anticuerpos multiespecíficos pueden comprender o no una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humana.

La invención proporciona además anticuerpos biespecíficos que comprenden una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano y una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humana, en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene un 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene un 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22. Dicho anticuerpo biespecífico tiene un doble efecto:

En primer lugar, a través de su región de unión a PD-L1, el anticuerpo se une a las células tumorales que expresan PD-L1, mientras que a través de su región de unión a CD3, el anticuerpo se une a las células T. De este modo, el anticuerpo acerca las células T a las células tumorales, facilitando así la destrucción de las células tumorales por parte de las células T. Además, sin estar limitado por ninguna teoría específica, se plantea la hipótesis de que acercar las células que expresan PD-L1 y las células T efectoras entre sí podría iniciar la liberación de interferón-γ, que a su vez podría sobrerregular PD-L1 en las células tumorales, facilitando así el reclutamiento de más anticuerpos contra el tumor y mejorando aún más su destrucción.

En segundo lugar, los anticuerpos biespecíficos de la invención inhiben la unión de PD-L1 humano a PD-1 humano evitando así que PD-L1 obstruya la inmunidad antitumoral a través de PD-1.

Los anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 son particularmente útiles en entornos terapéuticos en los que se desea el direccionamiento específico y la destrucción mediada por células T de células que expresan PD-L1. Los anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 son muy eficaces para mediar la destrucción de células que expresan PD-L1, incluidas, en algunas realizaciones, células con números de copias de PD-L1 bajos.

Los anticuerpos de la invención son capaces de unirse a células que expresan PD-L1, tales como células MDA-MB-231, PC3 o HELA. Además, los anticuerpos de la invención inhiben la interacción entre PD-L1 y PD-1 y pueden mediar la destrucción de células MDA-MB-231, PC3 y/o HELA mediante células T purificadas o PBMC.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de los anticuerpos de la invención en medicina, en particular para el tratamiento del cáncer.

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 y b12xPD-L1 y sus homólogos PD-L1 monoespecíficos y bivalentes a células MDA-MB-231. (A) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR e IgG1-338-FEAR, (B) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR e IgG1-547-FEAR, (C) Unión de bsIgG1-huCD3 -H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) Unión de bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR, (E) Unión de bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR, (F) Unión de bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR. Los datos mostrados son la intensidad media de fluorescencia (MFI) determinada por citometría de flujo, para un experimento representativo.
Figura 2: Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 y b12xPD-L1 y sus homólogos PD-L1 monoespecíficos y bivalentes a las células PC3. (A) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR e IgG1-338-FEAR, (B) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR e IgG1-547-FEAR, (C) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) Unión de bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR, (E) Unión de bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR, (F) Unión de bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR. Los datos mostrados son la intensidad media de fluorescencia (MFI) determinada por citometría de flujo, para un experimento representativo.
Figura 3: Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 y b12xPD-L1 y sus homólogos PD-L1 monoespecíficos y bivalentes a las células HELA. (A) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR e IgG1-338-FEAR, (B) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR e IgG1-547-FEAR, (C) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) Unión de bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR, (E) Unión de bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR, (F) Unión de bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR. Los datos mostrados son la intensidad media de fluorescencia (MFI) determinada por citometría de flujo, para un experimento representativo.
Figura 4: Unión de anticuerpos biespecíficos b12xPD-L1 y sus homólogos PD-L1 monoespecíficos y bivalentes a células SK-MES-1. (A) Unión de bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR e IgG1-338-FEAR, (B) Unión de bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR e IgG1-547-FEAR, (C) Unión de bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S -FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR. Los datos mostrados son la intensidad media de fluorescencia (MFI) determinada por citometría de flujo, para un experimento representativo.
Figura 5: Unión de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 y b12xPD-L1 y sus homólogos PD-L1 monoespecíficos y bivalentes a células CHO transfectadas con PD-L1 de cynomolgus. (A) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR e IgG1-338-FEAR, (B) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR e IgG1-547-FEAR, (C) Unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR, (D) Unión de bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR, (E) Unión de bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR, (F) Unión de bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR. Los datos mostrados son la intensidad de fluorescencia media (MFI) determinada mediante citometría de flujo, para un experimento representativo.
Figura 6: Bloqueo cruzado de anticuerpos. La determinación del bloqueo cruzado de anticuerpos se realizó mediante interferometría de biocapa. Todos los anticuerpos se produjeron en una estructura principal de FEAR IgG1. En la tabla,

las respuestas ≥ 0.1 nm se consideraron pares de anticuerpos no bloqueantes (los resultados se indican como números simples en la tabla), las respuestas por debajo de 0.1 se consideraron pares de anticuerpos bloqueantes (los resultados se indican como números en negrita en la tabla), mientras que algunas respuestas indicaron que ni los bloqueantes ni los no bloqueantes eran anticuerpos que mostraban un comportamiento de desplazamiento (los resultados se indican con un asterisco (*) en la tabla). MEDI = MEDI4736; MPDL = MPDL3280A. Se muestran figuras representativas para pares de anticuerpos (A) de desplazamiento, (B) bloqueantes y (C) no bloqueantes.

Figura 7: Efecto de los anticuerpos biespecíficos b12xPD-L1 y sus homólogos PD-L1 monoespecíficos y bivalentes sobre la interacción PD-1/PD-L1. El efecto de (A) bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR e IgG1-338-FEAR, (B) bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR e IgG1-547-FEAR, (C) bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR y IgG1-511-LC33S-FEAR se determinó en un bioensayo de bloqueo de PD-1/PD-L1. Los datos mostrados son las veces que hay inducción en relación con el control (sin anticuerpo añadido), para un experimento representativo.

Figura 8: Inducción de citotoxicidad con anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 *in vitro* en células MDA-MB-231. Se incubaron células MDA-MB-231 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR y bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR. Se utilizaron células T purificadas (A) o PBMC (B) como células efectoras. Los datos mostrados son % de células viables, para un experimento representativo.

Figura 9: Inducción de citotoxicidad de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 *in vitro* en células PC-3. Se incubaron células PC-3 bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR y bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR. Se utilizaron células T purificadas (A) o PBMC (B) como células efectoras. Los datos mostrados son % de células viables, para un experimento representativo.

Figura 10: Inducción de citotoxicidad de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 *in vitro* en células HELA. Se incubaron células HELA bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR y bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR. Se utilizaron células T purificadas (A) o PBMC (B) como células efectoras. Los datos mostrados son % de células viables, para un experimento representativo.

Figura 11: Proliferación y activación de células T por anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1.

Los anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 se probaron en un ensayo *in vitro* para medir la activación y proliferación de células T, utilizando células MDA-MB-231 como células diana y células T purificadas como células efectoras. (A) Recuento total de células T, (B) Recuento de células T $CD69^{pos}$, (C) Recuento de células T $CD25^{pos}$.

Figura 12: Veces que cambia la unión de anticuerpos PD-L1 a variantes de PD-L1 con mutaciones de alanina en las posiciones 42 a 131. Las veces que cambia se definió como $Log_{10}(gMFI_{[mutante\ de\ ala]}$ normalizado/$gMFI_{[wt]}$ normalizado). Los residuos en los que las veces que cambia la unión fue menor que la media de las veces que cambia: 1.5 x DE (indicado por la línea de puntos) se consideraron "pérdida de mutantes de unión". Los residuos con un cambio de veces positivo en la unión son pérdida de residuos de unión para el anticuerpo de control IgG1-625-FEAR-A488 (residuos 75 y 86). Los números sobre el eje x se refieren a las posiciones de los aminoácidos.

Figura 13: Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos de células MDA-MB-231 por anticuerpos PD-L1 de acuerdo con se determina en un ensayo de liberación de ^{51}Cr.

La ADCC de células MDA-MB-231 se determinó en un ensayo de liberación de ^{51}Cr *in vitro* con PBMC recién aisladas de un donante humano sano en una proporción E:T de 100:1. Para cada punto de datos, se presenta la media y la desviación estándar de 3 muestras replicadas. Se muestra un ejemplo representativo con PBMC de un donante.

Figura 14: Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos de células MDA-MB-231 por anticuerpos PD-L1 de acuerdo con se determina en un bioensayo luminiscente informador de ADCC.

La ADCC de células MDA-MB-231 mediante anticuerpos PD-L1 se cuantificó utilizando células indicadoras Jurkat que expresan FcγRIIIa y que expresan luciferasa tras la unión de FcγRIIIa. La producción de luciferasa se presenta mediante unidades relativas de luminiscencia (RLU). Para cada punto de datos, se presenta la media y la desviación estándar de los duplicados.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glicoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, Nueva York (1989)). Brevemente, cada cadena pesada normalmente está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH o VH) y una región constante de cadena pesada (abreviada en el presente documento como CH o CH). La región constante de la cadena pesada normalmente consta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región bisagra es la región entre los dominios CH1 y CH2 de la cadena pesada y es muy flexible. Los enlaces disulfuro en la región bisagra son parte de las interacciones entre dos cadenas pesadas en una molécula de IgG. Cada cadena ligera normalmente está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL o VL) y una región constante de cadena ligera (abreviada en el presente documento como CL o CL). La región constante de la cadena ligera normalmente está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o forma de bucles estructuralmente definidos), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y

Lesk J. Mol Biol. 196, 901-917 (1987)). A menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga, las secuencias de CDR en el presente documento se identifican de acuerdo con las reglas IMGT utilizando DomainGapAlign Versión 4.9.2 (2016-09-26) (Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27: 209-212 y Ehrenmann F., Kaas Q. y Lefranc M.-P. Nucleic Acids Res., 38, D301-307 (2010, véase también la dirección http de Internet http://www.imqt.org/). A menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga, la referencia a las posiciones de los aminoácidos en las regiones constantes en la presente invención se realiza de acuerdo con la numeración EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA. Mayo de 1969; 63(1): 78-85; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, 1991, Publicación del NIH No. 91-3242). Por ejemplo, la SEQ ID NO: 93 en el presente documento establece las posiciones de los aminoácidos 118-447 de acuerdo con la numeración EU, de la región constante de la cadena pesada de IgG1m(f).

El término "aminoácido correspondiente a la posición..." como se usa en el presente documento se refiere a un número de posición de aminoácido en una cadena pesada de IgG1 humana. Las posiciones de aminoácidos correspondientes en otras inmunoglobulinas se pueden encontrar mediante alineación con la IgG1 humana. Así, un aminoácido o segmento en una secuencia que "corresponde a" un aminoácido o segmento en otra secuencia es aquel que se alinea con el otro aminoácido o segmento usando un programa de alineación de secuencia estándar tal como ALIGN, ClustalW o similar, típicamente en configuraciones predeterminadas y tiene al menos un 50 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de identidad con una cadena pesada de IgG1 humana. Se considera bien conocido en la técnica cómo alinear una secuencia o segmento en una secuencia y determinar así la posición correspondiente en una secuencia a una posición de aminoácido de acuerdo con la presente invención.

El término "anticuerpo" (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina o un derivado de cualquiera de los mismos, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una vida media de períodos de tiempo significativos, tales como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro período relevante funcionalmente definido (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con la unión del anticuerpo al antígeno y/o tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. El término "región de unión a anticuerpo", utilizado en el presente documento, se refiere a la región que interactúa con el antígeno y comprende tanto las regiones VH como VL. El término anticuerpo, cuando se utiliza en el presente documento, comprende no sólo anticuerpos monoespecíficos, sino también anticuerpos multiespecíficos que comprenden múltiples, tales como dos o más, por ejemplo, tres o más regiones diferentes de unión a antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluidas varias células del sistema inmunológico (como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento tal como C1q, el primer componente en la vía clásica de activación del complemento. Como se indicó anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente, incluye fragmentos de un anticuerpo que son fragmentos de unión al antígeno, es decir, que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno abarcados dentro del término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab); (ii) fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio VH y también denominado anticuerpos de dominio (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11): 484-90); (vi) camélidos o nanocuerpos (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1): 111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permita formarse como una única cadena proteica en la que las regiones VH y VL se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla (scFv), véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos de cadena sencilla están incluidos dentro del término anticuerpo a menos que se indique lo contrario o se indique claramente por el contexto. Aunque dichos fragmentos generalmente se incluyen dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno de ellos de forma independiente son características únicas de la presente invención, que exhiben diferentes propiedades biológicas y utilidad. Estos y otros fragmentos de anticuerpos útiles en el contexto de la presente invención, así como los formatos biespecíficos de dichos fragmentos, se analizan con más detalle en el presente documento. También debe entenderse que el término anticuerpo, a menos que se especifique lo contrario, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos similares a anticuerpos, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, y fragmentos de anticuerpos que conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionados mediante cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo generado puede

poseer cualquier isotipo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por genes de la región constante de la cadena pesada. Cuando un isotipo particular, por ejemplo, IgG1, se menciona en el presente documento, el término no se limita a una secuencia de isotipo específica, por ejemplo, una secuencia particular de IgG1, pero se usa para indicar que el anticuerpo tiene una secuencia más cercana a ese isotipo, por ejemplo, IgG1, que a otros isotipos. Así, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 de la invención puede ser una variante de secuencia de un anticuerpo IgG1 de origen natural, incluidas variaciones en las regiones constantes.

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión única y afinidad por un epítopo particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico o transcromosómico, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionados a un célula inmortalizada.

El término "anticuerpo biespecífico" o "bs" en el contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo que tiene dos regiones de unión a antígeno diferentes definidas por diferentes secuencias de anticuerpo. En algunas realizaciones, dichas diferentes regiones de unión a antígeno se unen a diferentes epítopos en el mismo antígeno. Sin embargo, en realizaciones preferidas, dichas diferentes regiones de unión a antígeno se unen a diferentes antígenos diana. Un anticuerpo biespecífico puede tener cualquier formato, incluido cualquiera de los formatos de anticuerpos biespecíficos que se describen a continuación en el presente documento.

Cuando se usan en el presente documento, los términos "media molécula", "brazo de Fab" y "brazo" se refieren a un par de cadena pesada-cadena ligera.

Cuando se describe que un anticuerpo biespecífico comprende un anticuerpo de media molécula "derivado de" un primer anticuerpo, y un anticuerpo de media molécula "derivado de" un segundo anticuerpo, el término "derivado de" indica que el anticuerpo biespecífico fue generado recombinando, mediante cualquier método conocido, dichas medias moléculas de cada uno de dichos primer y segundo anticuerpos en el anticuerpo biespecífico resultante. En este contexto, no se pretende que la "recombinación" esté limitada por ningún método particular de recombinación y, por lo tanto, incluye todos los métodos para producir anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento a continuación, incluyendo, por ejemplo, la recombinación mediante intercambio de media molécula, así como la recombinación a nivel de ácido nucleico y/o mediante coexpresión de dos medias moléculas en las mismas células.

El término "anticuerpo monovalente" significa en el contexto de la presente invención que una molécula de anticuerpo es capaz de unirse a una única molécula de un antígeno y, por lo tanto, no es capaz de entrecruzar antígenos o células.

El término "longitud completa" cuando se usa en el contexto de un anticuerpo indica que el anticuerpo no es un fragmento, sino que contiene todos los dominios del isotipo particular que normalmente se encuentran para ese isotipo en la naturaleza, por ejemplo, los dominios VH, CH1, CH2, CH3, bisagra, VL y CL para un anticuerpo IgG1.

Cuando se usa en el presente documento, a menos que lo contradiga el contexto, el término "región Fc" se refiere a una región de anticuerpo que consiste en las dos secuencias Fc de las cadenas pesadas de una inmunoglobulina, en las que dichas secuencias de Fc comprenden al menos una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

Cuando se utiliza en el presente documento, el término "interacción heterodimérica entre la primera y segunda regiones CH3" se refiere a la interacción entre la primera región CH3 y la segunda región CH3 en una proteína heterodimérica con primera región CH3/segunda región CH3.

Cuando se utiliza en el presente documento, el término "interacciones homodiméricas de la primera y segunda regiones CH3" se refiere a la interacción entre una primera región CH3 y otra primera región CH3 en una proteína homodimérica con primera región CH3/primera región CH3 y la interacción entre una segunda región CH3 y otra segunda región CH3 en una proteína homodimérica con segunda región CH3/segunda región CH3.

Como se usa en el presente documento, los términos "capaz de unirse" o "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno o epítopo predeterminado típicamente es una unión con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-6} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-7} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, aproximadamente 10^{-10} M o menos, o aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos, cuando se determina usando interferometría de biocapa (BLI), por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 8, o, por ejemplo, cuando se determina usando tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 usando el antígeno como ligando y el anticuerpo como analito. El anticuerpo se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo, al menos 1,000 veces menor, tal como al menos 10,000 veces menor, por

ejemplo, al menos 100,000 veces menor que su afinidad por unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la K_D del anticuerpo, de modo que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), entonces el grado en el que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos 10,000 veces.

El término "k_d" (s^{-1}), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se conoce como valor k_{off} o k_{dis}.

El término "K_D" (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Se obtiene dividiendo kd por ka.

El término "k_a" ($M^{-1} \times s^{-1}$), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se conoce como valor k_{on} o constante de asociación.

En una realización preferida, se aísla el anticuerpo de la invención. Un "anticuerpo aislado", tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. En una realización preferida, un anticuerpo biespecífico aislado que se une específicamente a PD-L1 y una segunda diana, tal como CD3, está sustancialmente libre de anticuerpos monoespecíficos que se unen específicamente a PD-L1 o a la segunda diana, por ejemplo, CD3. En otra realización preferida, el anticuerpo, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, está sustancialmente libre de anticuerpos de origen natural que no son capaces de unirse a PD-L1. En una realización preferida adicional, el anticuerpo de la invención posee un cambio estructural en su secuencia de aminoácidos, con respecto a la estructura de un anticuerpo anti-PD-L1 de origen natural, en el que dicho cambio estructural hace que dicho anticuerpo exhiba una funcionalidad alterada con respecto a la funcionalidad exhibida por dicho anticuerpo anti-PD-L1 de origen natural, seleccionándose dicha funcionalidad del grupo que consiste en: (i) afinidad de unión a PD-L1, (ii) capacidad para inhibir la unión de PD-L1 a PD-1 y (iii) capacidad para inducir funciones efectoras mediadas por Fc.

El término "PD-L1", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a la proteína del ligando 1 de muerte programada. PD-L1 se encuentra en humanos y otras especies y, por lo tanto, el término "PD-L1" no se limita a PD-L1 humano a menos que el contexto lo contradiga. Las secuencias de PD-L1 humano, de macaco y de ratón se pueden encontrar a través del GenBank, n.º de acceso NP_054862.1, XP_005581836 y NP_068693, respectivamente.

El término "PD-L2", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a la proteína del ligando 2 de muerte programada 1 (GenBank, n.º de acceso a NP_079515).

El término "PD-1", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a la proteína de muerte programada 1 humana, también conocida como CD279.

El término "CD3", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la proteína del grupo de diferenciación 3 humana que forma parte del complejo de proteína correceptora de células T y está compuesta de cuatro cadenas distintas. CD3 también se encuentra en otras especies y, por lo tanto, el término "CD3" no se limita a CD3 humana a menos que el contexto lo contradiga. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena CD3γ (gamma) (cadena CD3γ humana UniProtKB/Swiss-Prot No P09693, o CD3γ de mono cynomolgus UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI7), una cadena CD3δ (delta) (CD3δ humana UniProtKB/Swiss-Prot Prot No P04234, o CD3δ de mono cynomolgus UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI8), dos cadenas CD3ε (épsilon) (CD3ε humano UniProtKB/Swiss-Prot No P07766 (SEQ ID NO: 95); CD3ε de cynomolgus UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI5 o CD3ε de rhesus UniProtKB/Swiss-Prot No G7NCB9), y una cadena CD3ζ (zeta) (CD3ζ humana UniProtKB/Swiss-Prot No P20963, CD3ζ de mono cynomolgus UniProtKB/Swiss-Prot No Q09TK0). Estas cadenas se asocian con una molécula conocida como receptor de células T (TCR) y generan una señal de activación en los linfocitos T. Las moléculas TCR y CD3 juntas forman el complejo TCR.

Un "anticuerpo PD-L1" o "anticuerpo anti-PD-L1" es un anticuerpo como se describió anteriormente, que se une específicamente al antígeno PD-L1, en particular PD-L1 humano.

Un "anticuerpo CD3" o "anticuerpo anti-CD3" es un anticuerpo como se describió anteriormente, que se une específicamente al antígeno CD3, en particular al CD3ε humano (épsilon).

Un "anticuerpo CD3xPD-L1", "anticuerpo anti-CD3xPD-L1", "anticuerpo PD-L1xCD3" o "anticuerpo anti-PD-L1xCD3" es un anticuerpo biespecífico, que comprende dos regiones de unión a antígeno diferentes, una de las cuales se une específicamente al antígeno PD-L1 y una de las cuales se une específicamente a CD3.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de las regiones VL, regiones VH o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de una VL, VH o CDR utilizada en el contexto de un anticuerpo todavía permite que el anticuerpo retenga al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) de la afinidad y/o la especificidad/selectividad

del anticuerpo "de referencia" u "original" y en algunos casos, dicho anticuerpo puede estar asociado con mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo original.

Tales variantes funcionales normalmente conservan una identidad de secuencia significativa con respecto al anticuerpo original. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio, que debe introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede, por ejemplo, determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos pueden determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970).

Las variantes ejemplares incluyen aquellas que difieren de las regiones VH y/o VL y/o CDR de las secuencias del anticuerpo original principalmente por sustituciones conservadoras; por ejemplo, 10, tales como 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 de las sustituciones en la variante son reemplazos conservadores de residuos de aminoácidos.

En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservadoras pueden definirse mediante sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en la siguiente tabla:

Clases de residuos de aminoácidos para sustituciones conservadoras

Residuos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Residuos básicos	Lys (K), Arg (R) y His (H)
Residuos hidrofílicos sin carga	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Residuos alifáticos sin carga	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Residuos no polares sin carga	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Residuos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

En el contexto de la presente invención, las siguientes notaciones se utilizan, a menos que se indique lo contrario, para describir una mutación; i) la sustitución de un aminoácido en una posición determinada se escribe como, por ejemplo, K409R que significa una sustitución de una Lisina en la posición 409 por una Arginina; y ii) para variantes específicas se utilizan los códigos específicos de tres o una letra, incluidos los códigos Xaa y X para indicar cualquier residuo de aminoácido. Así, la sustitución de lisina por arginina en la posición 409 se denomina: K409R, y la sustitución de lisina por cualquier residuo de aminoácido en la posición 409 se denomina K409X. En caso de eliminación de lisina en la posición 409, se indica con K409*.

En el contexto de la presente invención, "competencia" se refiere a una reducción significativa en la propensión de una molécula particular a unirse a un compañero de unión particular en presencia de otra molécula que se une al compañero de unión. "Competencia" puede referirse tanto a "bloqueo" como a "desplazamiento", es decir, una molécula competidora puede ser una molécula bloqueadora o desplazadora. "Desplazamiento" se refiere a una condición en la que un segundo anticuerpo puede desplazar un antígeno de un complejo antígeno-anticuerpo (formado anteriormente) dando como resultado el intercambio del antígeno (Abdiche et al., 2017 Plos One 12(1): e0169535). La competencia por la unión a PD-L1 por dos o más anticuerpos anti-PD-L1 puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada. En una realización, la competencia se determina como se describe en el Ejemplo 9 del presente documento.

De manera similar, en el contexto de la presente invención, "inhibición de la unión de PD-L1 a PD-1" se refiere a cualquier reducción detectablemente significativa en la unión de PD-L1 a PD-1 en presencia de un anticuerpo capaz de unirse a PD-L1. Normalmente, inhibición significa una reducción de al menos aproximadamente un 10 %, tal como al menos aproximadamente un 15 %, por ejemplo, una reducción de al menos aproximadamente un 20 %, tal como una reducción de al menos un 40 % en la unión entre PD-L1 y PD-1, causada por la presencia de un anticuerpo anti-PD-L1. La inhibición de la unión de PD-L1 a PD-1 puede determinarse mediante cualquier técnica adecuada. En una realización, la inhibición se determina como se describe en el Ejemplo 10 del presente documento.

El término "epítopo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos suelen consistir en agrupaciones superficiales de moléculas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y suelen tener características marco tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al segundo se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. El epítopo puede comprender residuos de aminoácidos directamente implicados en la unión y otros residuos de aminoácidos, que no están directamente implicados en la unión, tales como residuos de aminoácidos que están efectivamente bloqueados o cubiertos por el péptido de unión específicamente al antígeno (en otras palabras, el residuo de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión al antígeno específico).

El término "anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo en el que la región variable se deriva de una especie no humana (por ejemplo, derivada de roedores) y la región constante se deriva de una especie diferente, tal como humana. Se desarrollan anticuerpos monoclonales quiméricos para aplicaciones terapéuticas para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos. Los términos "región variable" o "dominio variable", tal como se usan en el contexto de anticuerpos quiméricos, se refieren a una región que comprende las CDR y las regiones marco de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina. Se pueden generar anticuerpos quiméricos usando técnicas de ADN estándar como se describe en Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. El anticuerpo quimérico puede ser un anticuerpo recombinante modificado genética o enzimáticamente. Está dentro del conocimiento del experto generar un anticuerpo quimérico y, por lo tanto, la generación del anticuerpo quimérico de acuerdo con la presente invención se puede realizar mediante otros métodos distintos a los descritos en el presente documento.

El término "anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo no humano modificado genéticamente, que contiene dominios constantes de anticuerpo humano y dominios variables no humanos modificados para contener un alto nivel de homología de secuencia con dominios variables humanos. Esto se puede lograr injertando las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos no humanos, que juntas forman el sitio de unión al antígeno, en una región marco aceptora (FR) humana homóloga (véanse los documentos WO92/22653 y EP0629240). Para reconstituir completamente la afinidad de unión y la especificidad del anticuerpo original, puede ser necesaria la sustitución de residuos marco del anticuerpo original (es decir, el anticuerpo no humano) en las regiones marco humanas (retromutaciones). El modelado de homología estructural puede ayudar a identificar los residuos de aminoácidos en las regiones marco que son importantes para las propiedades de unión del anticuerpo. Por lo tanto, un anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de CDR no humanas, principalmente regiones marco humanas que comprenden opcionalmente una o más retromutaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos no humana, y regiones constantes completamente humanas. Opcionalmente, se pueden aplicar modificaciones de aminoácidos adicionales, que no son necesariamente retromutaciones, para obtener un anticuerpo humanizado con características preferidas, tales como afinidad y propiedades bioquímicas.

El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco humanas. Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluida la metodología de anticuerpos monoclonales convencionales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación en fagos usando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos. Un sistema animal adecuado para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión se conocen en la técnica. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden, por lo tanto, por ejemplo, pueden generarse utilizando ratones o ratas transgénicos o transcromosómicos que porten partes del sistema inmunológico humano en lugar del sistema de ratón o rata. Por consiguiente, en una realización, un anticuerpo humano se obtiene de un animal transgénico, tal como un ratón o una rata, que porta secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana en lugar de secuencias de inmunoglobulina animal. En tales realizaciones, el anticuerpo se origina a partir de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana introducidas en el animal, pero la secuencia de anticuerpo final es el resultado de que dichas secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana se modifiquen adicionalmente mediante hipermutaciones somáticas y maduración de afinidad por la maquinaria endógena de anticuerpos animales, véase, por ejemplo, Méndez et al. 1997 Nat Genet. 15(2): 146-56. El término "condiciones reductoras" o "entorno reductor" se refiere a una condición o un entorno en el que es más probable que un sustrato, en el presente documento un residuo de cisteína en la región bisagra de un anticuerpo, se reduzca a que se oxide.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión, por ejemplo, un vector de expresión que codifica un anticuerpo de la invención. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 o NS0, y células linfocíticas.

El término "tratamiento" se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo terapéuticamente activo de la presente invención con el fin de aliviar, mejorar, detener o erradicar (curar) síntomas o estados patológicos.

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente

eficaz de un anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

El término "anticuerpo antiidiotípico" se refiere a un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

Otros aspectos y realizaciones de la invención.

Como se describió anteriormente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano y una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humano, en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene un 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene un 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22, en la que el anticuerpo inhibe la unión de PD-L1 humano a PD-1 humano. Dichos anticuerpos biespecíficos comprenden así dos regiones de unión a antígeno diferentes, una que tiene una especificidad de unión para PD-L1 y otra que tiene una especificidad de unión para CD3.

Dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en la que la secuencia de CDR3 de VH se establece en: la SEQ ID NO: 21.

Dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se establece en las SEQ ID NOs: 19, 20 y 21, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 23, la secuencia DDN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 24, respectivamente. En otra realización, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con una secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18.

Dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con una secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22.

Dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22.

De acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 22.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente del primer aspecto de la invención comprenden una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humana.

En una realización, la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano comprende la región variable de cadena pesada (VH) CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 28, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente.

Las seis secuencias de CDR definidas anteriormente se derivan de un anticuerpo de ratón denominado SP34. Se han generado versiones humanizadas de este anticuerpo, y los anticuerpos humanizados se denominan huCD3 en el presente documento y se describen además en el documento WO2015001085 (Genmab).

En una realización preferida del anticuerpo biespecífico de la invención, dicho anticuerpo biespecífico comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 como se establece en las SEQ ID NOs: 19, 20 y 21, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 23, la secuencia DDN y la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 24, respectivamente, y una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano que comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tiene las secuencias como se establece en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 28, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia como se establece en la SEQ ID NO: 31, respectivamente.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano que comprende una región variable de cadena pesada (VH), en la que dicha secuencia de VH tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 25.

En otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano que comprende una región variable de cadena ligera (VL), en la que dicha secuencia de VL tiene al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 29.

En una realización preferida, la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano comprende una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29.

En un aspecto, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención pueden modificarse para reducir la afinidad de los anticuerpos. Esto puede resultar ventajoso en algunos entornos y conducir a una mayor eficacia. En particular, la baja afinidad de unión a CD3ε humano puede tener un impacto en la motilidad de las células T en circulación y en el sitio del tumor, lo que conduce a una mejor interacción de las células T con las células tumorales, ver Mølhøj et al., Molecular Immunology 44 (2007).

Por consiguiente, en una realización diferente del anticuerpo biespecífico de la invención que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano y una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humana, dicho anticuerpo biespecífico:

(i) tiene una menor afinidad por la unión a CD3ε humano en comparación con un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno capaz de comprender una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, preferiblemente en la que dicha afinidad es al menos 2 veces menor, por ejemplo, al menos 5 veces menor, tal como al menos 10 veces menor, por ejemplo, al menos 25 veces menor, tal como al menos 50 veces menor, y
(ii) es capaz de mediar la citotoxicidad dependiente de la concentración de células MDA-MB-231, células PC-3 y/o células HELA cuando se utilizan PBMC o células T purificadas como células efectoras.

De manera similar, en una realización, el anticuerpo de la invención comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humana, en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humana:

(i) tiene una menor afinidad por la unión a CD3ε humano en comparación con un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno capaz de comprender una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, preferiblemente en el que dicha afinidad es al menos 2 veces menor, por ejemplo, al menos 5 veces menor, tal como al menos 10 veces menor, por ejemplo, al menos 25 veces menor, tal como al menos 50 veces menor, y
(ii) es capaz de mediar la citotoxicidad dependiente de la concentración de células MDA-MB-231, células PC-3 y/o células HELA cuando se utilizan PBMC o células T purificadas como células efectoras.

La afinidad por CD3ε humano puede, por ejemplo, medirse usando la determinación de la afinidad de unión de octetos como se describe en el Ejemplo 7 del documento WO2017009442.

La capacidad de un anticuerpo para mediar la citotoxicidad mediante PBMC o células T purificadas puede, por ejemplo, determinarse como se describe en el Ejemplo 11 en el presente documento, es decir, se siembran y cultivan células MDA-MB-231, células PC-3 o células HELA en pocillos. Se añaden células tumorales, PBMC y diluciones seriadas de anticuerpos y, tras la incubación, las células tumorales se tiñen para comprobar su viabilidad.

En el presente documento, huCD3-H1L1 se refiere a un anticuerpo anti-CD3 que tiene secuencias de VH y VL como se establece en las SEQ ID NOs: 25 y 29. IgG1-huCD3-FEAL se refiere a una variante del mismo que comprende las sustituciones L234F, L235E, D265A y F405L (ver también en otra parte del presente documento).

En el documento WO2017009442 (Genmab) se han descrito ejemplos de variantes de IgG1-huCD3-FEAL que tienen afinidad reducida por CD3ε humana. El Ejemplo 7 (Tabla 6) del documento WO2017009442 divulga afinidades de IgG1-huCD3-FEAL y siete variantes de la misma, medidas usando la determinación de la afinidad de unión de octetos:

Anticuerpo	<KD> (nM)	SDEV	SEM	CV
IgG1-huCD3-FEAL	15	6	3	37
IgG1-huCD3-Y114V-FEAL	29	8	4	26
IgG1-huCD3-T31P- FEAL	42	9	4	21
IgG1-huCD3-Y114M-FEAL	42	14	8	33
IgG1-huCD3-Y114R-FEAL	46	10	6	22

IgG1-huCD3-S110A-FEAL	72	15	6	21
IgG1-huCD3-T31M-FEAL	99	23	13	23
IgG1-huCD3-H101G-FEAL	683	169	97	25

En una realización del anticuerpo biespecífico de la invención, la región de unión al antígeno capaz de unirse a CD3ε humano comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 99, 27 y 28, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o

(ii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 100, 27 y 28, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o

(iii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 101, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o

(iv) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 102, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o

(v) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 103, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o

(vi) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 104, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o

(vii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 105, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente.

En otra realización, la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano comprende:

(i) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 39 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(ii) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 40 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(iii) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 41 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(iv) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 42 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(v) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 43 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(vi) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 44 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(vii) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 45 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29.

En realizaciones preferidas adicionales del anticuerpo biespecífico de la invención, cada una de las regiones de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), y en la que dichas regiones variables comprenden cada una tres secuencias de CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, y cuatro secuencias marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente.

En realizaciones preferidas adicionales del anticuerpo biespecífico de la invención, el anticuerpo comprende dos regiones constantes de cadena pesada (CH) y dos regiones constantes de cadena (CL).

En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico comprende una primera y una segunda cadena pesada, en la que cada una de dichas primera y segunda cadenas pesadas comprende al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3, en la que en dicha primera cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en una posición correspondiente a una posición seleccionada del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 (de acuerdo con la numeración EU) ha sido sustituido, y en dicha segunda cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en una posición correspondiente a una posición seleccionada del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 (de acuerdo con la numeración EU) ha sido sustituido, y en la que dicho primera y dicha segunda cadenas pesadas no se sustituyen en las mismas posiciones.

Lo más preferiblemente, (i) el aminoácido en la posición correspondiente a F405 (de acuerdo con la numeración EU) es L en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 (de acuerdo con la numeración EU) es R en dicha segunda cadena pesada, o (ii) el aminoácido en la posición correspondiente a K409 (de acuerdo con la numeración EU) es R en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 (de acuerdo con la numeración EU) es L en dicha segunda cadena pesada.

En una realización adicional particularmente preferida, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico CD3xPD-L1 que comprende una primera y una segunda cadena pesada, en la que las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU tanto de la primera cadena pesada como de la segunda cadena pesada son F y E, respectivamente, y en la que (i) la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es L, y la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es R, o (ii) la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es R, y la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es L.

En una realización adicional particularmente preferida, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico CD3xPD-L1 que comprende una primera y una segunda cadena pesada, en la que las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de tanto la primera cadena pesada como la segunda cadena pesada son F, E y A, respectivamente, y en la que (i) la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es L, y la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es R, o (ii) la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es R, y la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es L.

Nuevas clases de anticuerpos PD-L1

En un aspecto adicional, la invención proporciona nuevos anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22. Los anticuerpos de este aspecto de la invención pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos y, si son multiespecíficos, dichos anticuerpos multiespecíficos pueden comprender, o no, una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humana.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano tiene las características definidas en el presente documento anteriormente.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, en la que la unión del anticuerpo a un PD-L1 mutante en el que uno cualquiera o más de los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 58 (E58) y 113 (R113) en la SEQ ID NO: 94 han sido sustituidas con alaninas, están reducidas en comparación con PD-L1 de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 94 ; la unión reducida se determina como las veces que cambia la unión de dicho anticuerpo que es menor que la media de las veces que cambia la unión sobre todos los mutantes de alanina - 1.5xSD, en la que SD es la desviación estándar de todas las veces que cambia calculada para el anticuerpo contra el mutante PDL1 y las veces que cambia la unión se calcula como se establece en el Ejemplo 13.

El anticuerpo puede unirse a un epítopo en PD-L1 (SEQ ID NO: 94), comprendiendo dicho epítopo el residuo de aminoácido en la posición 58 (E58) y/o el residuo de aminoácido en la posición 113 (R113) de la SEQ ID NO: 94.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo de acuerdo con la invención es capaz de inducir la lisis dependiente de la dosis de células epiteliales de un adenocarcinoma, tal como MDA-MB-231, a través de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

En realizaciones adicionales, el anticuerpo de acuerdo con la invención es capaz de reducir el número de células en un cultivo de dichas células epiteliales en al menos un 5 %, tal como al menos un 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o al menos el 10 % como resultado de la lisis celular.

La ADCC se puede determinar *in vitro* en un ensayo de liberación de ^{51}Cr, tal como el ensayo descrito en el ejemplo 14. En particular, la ADCC se determina *in vitro*, incubando dichas células epiteliales con una composición que comprende el anticuerpo y células efectoras, tales como células mononucleares de sangre periférica (PBMC), durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO_2, estando la cantidad de anticuerpo en dicha composición dentro del intervalo de 0.1-1 µg/mL y la proporción de células efectoras a células epiteliales siendo 100:1.

La lisis de células epiteliales se puede determinar *in vitro* en un ensayo indicador de luciferasa como sustituto de ADCC, tal como el bioensayo indicador luminiscente de ADCC descrito en el ejemplo 14.

La ADCC se puede determinar en particular *in vitro*, mediante

i) poner en contacto un cultivo de dichas células epiteliales con una composición que comprende el anticuerpo y células T humanas Jurkat que expresan de manera estable FcγRIIIa (CD16) y luciferasa de luciérnaga (células efectoras), en una proporción de célula efectora:célula epitelial de 1:1.
ii) ajustar el cultivo de las células epiteliales y de las células efectoras a temperatura ambiente durante 15 minutos,
iii) incubar el cultivo de las células epiteliales y las células efectoras con un sustrato de luciferasa, y
iv) determinar la producción de luciferasa en dicho cultivo celular;

la cantidad de anticuerpo en dicha composición está dentro del intervalo de 0.5-250 ng/mL y la proporción de células efectoras a células epiteliales es de 1:1.

La ADCC de dichas células epiteliales se puede determinar en un ensayo indicador de luciferasa, tal como un ensayo indicador definido en la reivindicación 23 o 24, luego la ADCC observada después de la incubación de un cultivo de las células epiteliales con una composición de prueba que comprende dicho anticuerpo es al menos 1.5 veces la ADCC observada después de la incubación de un cultivo de células epiteliales con una composición que comprende anticuerpo de referencia; ADCC se determina como unidades relativas de luminiscencia (RLU), siendo la concentración de anticuerpo en dicha composición de prueba y en dicha composición que comprende un anticuerpo de referencia la misma y dentro del intervalo de 20 a 250 ng/mL, y el anticuerpo de referencia se selecciona de entre:

a) un anticuerpo que comprende la secuencia de VH establecida en la SEQ ID NO: 74 y la secuencia de VL establecida en la SEQ ID NO: 78; y
b) un anticuerpo que comprende la secuencia de VH establecida en la SEQ ID NO: 81 y la secuencia de VL establecida en la SEQ ID NO: 85.

En una realización, se proporciona un anticuerpo que comprende un agente de unión a antígeno.

De acuerdo con la invención, se proporciona un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene 100 % identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID

De acuerdo con la invención, se proporciona un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 22.

En una realización, el anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es monovalente.

En otra realización, el anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es un anticuerpo monoespecífico que comprende dos o más regiones de unión a antígeno idénticas.

En una realización adicional, el anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es un anticuerpo bivalente que tiene dos regiones de unión a antígeno capaces de unirse a PD-L1 humano y en la que dichas dos regiones de unión a antígeno tienen secuencias de regiones variables idénticas.

En una realización diferente, el anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es un anticuerpo biespecífico bivalente, que, además de dicha (primera) región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, L1, comprende una (segunda) región de unión a antígeno capaz de unirse a un segundo antígeno, en la que dicho segundo antígeno es CD3ε humano.

En una realización diferente, el anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es un anticuerpo biespecífico bivalente, que, además de dicha (primera) región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, L1, comprende una (segunda) región de unión a antígeno capaz de unirse a un segundo antígeno o a uno diferente.

De acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22.

De acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 22.

En una realización del presente documento, el anticuerpo inhibe la unión de PD-L1 humano a PD-1 humano.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo biespecífico bivalente que comprende una primera región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano y una segunda región de unión a antígeno capaz de unirse a un segundo antígeno o a un epítopo diferente de PD-L1 humano, en la que dicho segundo antígeno opcionalmente no es CD3ε humana, y en la que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en la que la

De acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VH establecida en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22.

De acuerdo con la invención, dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 22.

En una realización del presente documento, el anticuerpo inhibe la unión de PD-L1 humano a PD-1 humano.

Realizaciones adicionales de los anticuerpos de la invención.

En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención se une a PD-L1 humano con una KD de aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, por ejemplo, aproximadamente 10^{-10} M o menos, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 8 en el presente documento.

En una realización adicional, el anticuerpo de la invención media la citotoxicidad dependiente de la concentración de células MDA-MB-231, células PC-3 y/o células HELA cuando se utilizan células T purificadas como células efectoras, cuando se analizan como se describe en el Ejemplo 11 del presente documento.

El anticuerpo de la invención no se une al PD-L2 humana.

Formatos de anticuerpos

Como se describió anteriormente, se han descrito en la técnica diversos formatos de anticuerpos. El anticuerpo de la invención puede ser en principio de cualquier isotipo. La elección del isotipo normalmente estará guiada por las funciones efectoras mediadas por Fc deseadas, tales como la inducción de ADCC, o el requisito de un anticuerpo desprovisto de la función efectora mediada por Fc (anticuerpo "inerte"). Isotipos ejemplares son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Puede usarse cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana, kappa o lambda. La función efectora de los anticuerpos de la presente invención se puede cambiar mediante el cambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos. En una realización, ambas cadenas pesadas de un anticuerpo de la presente invención son del isotipo IgG1, por ejemplo, una IgG1,κ. Opcionalmente, la cadena pesada puede modificarse en la región bisagra y/o CH3 como se describe en otra parte del presente documento.

Preferiblemente, cada una de las regiones de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), y en la que dichas regiones variables comprenden cada una tres secuencias de CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, y cuatro secuencias marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente. Además, preferiblemente, el anticuerpo comprende dos regiones constantes de cadena pesada (CH) y dos regiones constantes de cadena ligera (CL).

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1 de longitud completa. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 de longitud completa, preferiblemente con una región bisagra estabilizada. En la técnica se han descrito modificaciones que estabilizan la región bisagra de IgG4, tales como la mutación S228P en la bisagra central, ver, por ejemplo, Labrijn et al., 2009 Nat Biotechnol. 27(8): 767-71.

En otras realizaciones, el anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab), un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento Fd o un fragmento Fv.

Los anticuerpos de la invención son preferiblemente humanos, humanizados o quiméricos. En realizaciones en las que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, ambas medias moléculas pueden ser humanas, humanizadas o quiméricas, o las medias moléculas pueden diferir en carácter con respecto al origen de la secuencia.

Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo biespecífico comprende dos medias moléculas, cada una de las cuales comprende una región de unión a antígeno, en la que

(i) la(s) media(s) molécula(s) que comprende(n) la región de unión al antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es/son quimérica(s), y/o
(ii) la media molécula que comprende la región de unión al antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humana, si está presente, es quimérica.

Por ejemplo, en otra realización, el anticuerpo biespecífico comprende dos medias moléculas, cada una de las cuales comprende una región de unión a antígeno, en la que

(i) la(s) media(s) molécula(s) que comprende(n) la región de unión al antígeno capaz de unirse al PD-L1 humano es/son humanizada(s), y/o
(ii) la media molécula que comprende la región de unión al antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humana, si está presente, está humanizada.

Por ejemplo, en una realización adicional, el anticuerpo biespecífico comprende dos medias moléculas, cada una de las cuales comprende una región de unión a antígeno, en la que

(i) la(s) media(s) molécula(s) que comprende(n) la región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es/son humana(s), y/o

(ii) la media molécula que comprende la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humana, si está presente, es humana.

Así, por ejemplo, en una realización, la(s) región(es) de unión a antígeno capaz(ces) de unirse a PD-L1 humano es/son humanizada(s), y la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano (épsilon), si está presente, está humanizada.

En una realización diferente, la(s) región(es) de unión a antígeno capaz(ces) de unirse a PD-L1 humano es/son humana(s), y la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humana, si está presente, es humana.

En una realización adicional, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano y una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humana, en la que la media molécula que comprende la región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es humana, humanizada o quimérica, y la media molécula que comprende la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humana está humanizada.

Preferiblemente, la media molécula que comprende la región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano es humana y la media molécula que comprende la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humana está humanizada.

Formatos de anticuerpos biespecíficos

Se conocen en la técnica muchos formatos y usos diferentes de anticuerpos biespecíficos, y fueron revisados por Kontermann; Drug Discov Today, 2015 Jul; 20(7): 838-47 y; MAbs, 2012 Mar-Apr; 4 (2): 182-97.

Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención no se limita a ningún formato o método biespecífico particular para producirlo.

Los ejemplos de moléculas de anticuerpo biespecífico que pueden usarse en la presente invención comprenden (i) un único anticuerpo que tiene dos brazos que comprenden diferentes regiones de unión a antígeno; (ii) un anticuerpo de

cadena sencilla que tiene especificidad por dos epítopos diferentes, por ejemplo, a través de dos scFv unidos en tándem mediante un conector peptídico adicional; (iii) un anticuerpo de dominio variable dual (DVD-Ig), en el que cada cadena ligera y cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, en: Antibody Engineering, Springer Berlín Heidelberg (2010)); (iv) un fragmento biespecífico (Fab')2 unido químicamente; (v) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena sencilla que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vi) un flexicuerpo, que es una combinación de scFv con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (vii) una molécula denominada de "acoplamiento y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" de la proteína quinasa A, que, cuando se aplica a Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (viii) una denominada molécula Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos extremos de un brazo Fab humano; y (ix) un diacuerpo.

En una realización, el anticuerpo biespecífico de la presente invención es un diacuerpo, un cuerpo cruzado o un anticuerpo biespecífico obtenido mediante un intercambio controlado de brazos Fab (tal como se describe en el documento WO2011131746 (Genmab)).

Los ejemplos de diferentes clases de anticuerpos biespecíficos incluyen, entre otros, (i) moléculas similares a IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización; (ii) moléculas de direccionamiento dual recombinantes similares a IgG, en las que los dos lados de la molécula contienen cada uno el fragmento Fab o parte del fragmento Fab de al menos dos anticuerpos diferentes; (iii) moléculas de fusión de IgG, en las que los anticuerpos IgG de longitud completa se fusionan con un fragmento Fab adicional o partes de un fragmento Fab; (iv) moléculas de fusión de Fc, en las que moléculas de Fv de cadena sencilla o diacuerpos estabilizados están fusionados a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de las mismas; (v) moléculas de fusión de Fab, en las que diferentes fragmentos Fab están fusionados entre sí, fusionados a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de las mismas; y (vi) anticuerpos de cadena pesada y basados en ScFv y diacuerpos (por ejemplo, anticuerpos de dominio, nanocuerpos) en los que diferentes moléculas de Fv de cadena sencilla o diferentes diacuerpos o diferentes anticuerpos de cadena pesada (por ejemplo, anticuerpos de dominio, nanocuerpos) están fusionados entre sí o a otra proteína o molécula portadora fusionada a dominios constantes de cadena pesada, regiones Fc o partes de las mismas.

Los ejemplos de moléculas similares a IgG con moléculas de dominio CH3 complementarias incluyen, entre otras, las moléculas Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech; Roche, WO2011069104), las denominadas moléculas Botones en Ojales (Genentech, WO9850431), CrossMAb (Roche, WO2011117329) y las moléculas electrostáticamente emparejadas (Amgen, EP1870459 y WO2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304), las moléculas LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), moléculas del cuerpo DIG y del cuerpo PIG (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), las moléculas del cuerpo del dominio modificado por intercambio de cadena (SEEDbody) (EMD Serono, WO2007110205), las moléculas Biclonics (Merus, WO2013157953), moléculas FcΔAdp (Regeneron, WO201015792), moléculas biespecíficas de IgG1 e IgG2 (Pfizer/Rinat, WO11143545), moléculas de estructura Azymetric (Zymeworks/Merck, WO2012058768), Moléculas mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), anticuerpos biespecíficos bivalentes (WO2009080254) y las moléculas DuoBody® (Genmab, WO2011131746).

Los ejemplos de moléculas de direccionamiento dual similares a IgG recombinantes incluyen, entre otros, moléculas de Ig de direccionamiento dual (DT) (WO2009058383), anticuerpo dos en uno (Genentech; Bostrom, et al., 2009. Science 323, 1610-1614), Mab entrecruzados (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, WO2008003116), moléculas Zybody (Zyngenia; LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Abr; 5(2): 208-18), enfoques con cadena ligera común (Crucell/Merus, US7,262,028), κλBodies (NovImmune, WO2012023053) y CovX-body (CovX/Pfizer; Doppalapudi, V.R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501-506).

Los ejemplos de moléculas de fusión de IgG incluyen, entre otros, moléculas de Ig de dominio variable dual (DVD) (Abbott, US 7,612,181), anticuerpos de doble cabeza de dominio dual (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), moléculas biespecíficas similares a IgG (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb; 32(2): 191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ; Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30; 393(3):672-92) y moléculas BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), moléculas HERCULES (Biogen Idec, US007951918), moléculas de fusión scFv (Novartis), moléculas de fusión scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) y moléculas TvAb (Roche, WO2012025525, WO2012025530).

Los ejemplos de moléculas de fusión de Fc incluyen, entre otros, fusiones ScFv/Fc (Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep; 42(6): 1179-88), moléculas SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting de 2009 (Abstract # 5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625), moléculas de tecnología de redireccionamiento de afinidad dual (Fc-DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538) y moléculas duales (ScFv)2-Fab (Centro Nacional de Investigación en Medicina de Anticuerpos - China).

Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos de fusión Fab incluyen, entre otros, moléculas F(ab)2 (Medarex/AMGEN; Deo et al. J Immunol. 1998 Feb 15; 160(4): 1677-86), moléculas de acción dual o Bis-Fab (Genentech, Bostrom, et al

2009. Science 323, 1610-1614), moléculas de acoplamiento y bloqueo (DNL) (ImmunoMedics, WO2003074569, WO2005004809), moléculas bivalentes biespecíficas (Biotecnol, Schoonjans, J Immunol. 2000 Dec 15; 165(12): 7050-7) y moléculas Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009040562 A1).

Los ejemplos de anticuerpos ScFv, basados en diacuerpos y de dominio incluyen, entre otros, moléculas biespecíficas de activación de células T (BiTE) (Micromet, WO2005061547), moléculas de diacuerpos en tándem (TandAb) (Affimed) Le Gall et al., Protein Ing Des Sel. 2004 Apr;17(4):357-66), moléculas de tecnología de redireccionamiento de afinidad dual (DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538), moléculas de diacuerpos de cadena sencilla (Lawrence, FEBS Lett. 1998 Apr 3; 425(3): 479-84), anticuerpos similares a TCR (AIT, ReceptorLogics), fusión ScFv de albúmina sérica humana (Merrimack, WO2010059315) y moléculas COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug; 88(6): 667-75), nanocuerpos de direccionamiento dual (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010) y anticuerpos de un solo dominio de cadena pesada de direccionamiento dual.

En un aspecto, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende una primera secuencia de Fc que comprende una primera región CH3, y una segunda secuencia de Fc que comprende una segunda región CH3, en la que las secuencias de la primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3. En los documentos WO2011131746 y WO2013060867 (Genmab) se proporcionan más detalles sobre estas interacciones y cómo se pueden lograr.

Como se describe más detalladamente en el presente documento, se puede obtener un anticuerpo biespecífico estable, tal como un anticuerpo CD3xPD-L1 biespecífico, con alto rendimiento usando un método particular sobre la base de un anticuerpo PD-L1 homodimérico de partida y un anticuerpo de partida homodimérico capaz de unir un epítopo PD-L1 diferente o un antígeno diferente (tal como un anticuerpo CD3 inicial homodimérico) que contiene solo unas pocas mutaciones asimétricas, conservadoras en las regiones CH3. Las mutaciones asimétricas significan que las secuencias de dichas regiones CH3 primera y segunda contienen sustituciones de aminoácidos en posiciones no idénticas.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y la segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y en la que la primera y segunda regiones CH3 no están sustituidas en la mismas posiciones.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 366, y dicha segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 368, 370, 399, 405, 407 y 409. En una realización, el aminoácido en la posición 366 se selecciona de Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val o Gln.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 368, y dicha segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo compuesto por: 366, 370, 399, 405, 407 y 409.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 370, y dicha segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo compuesto por: 366, 368, 399, 405, 407 y 409.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 399, y dicha segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo compuesto por: 366, 368, 370, 405, 407 y 409.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 405, y dicha segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo compuesto por: 366, 368, 370, 399, 407 y 409.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 407, y dicha segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 409.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el

presente documento, la primera región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 409, y dicha segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407.

Por consiguiente, en una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 contienen mutaciones asimétricas, es decir, mutaciones en diferentes posiciones en las dos regiones CH3, por ejemplo, una mutación en la posición 405 en una de las regiones CH3 y una mutación en la posición 409 en la otra región CH3.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407. En una de dichas realizaciones, dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Phe, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Cys, Lys o Leu, en la posición 405. En una realización adicional de este documento, dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gin, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly, por ejemplo, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 405.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende un aminoácido distinto de Phe, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Leu, Met o Cys, en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En una realización adicional del mismo, dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly, por ejemplo, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En una realización adicional del presente documento, dicha primera región CH3 comprende una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende un aminoácido distinto de Phe, Arg o Gly, por ejemplo, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Met, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 405 y una Lys en la posición 409. En otra realización, dicha primera región CH3 comprende Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

En una realización adicional del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 comprende un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405. En una realización adicional, dicha primera región CH3 comprende una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En una realización aún adicional del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 comprende una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409, una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 comprende un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 comprende una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha la segunda región CH3 comprende una Lys en la posición 409 y: a) una Ile en la posición 350 y una Leu en la posición 405, o b) una Thr en la posición 370 y una Leu en la posición 405.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 comprende una Thr en la posición 350, una Lys en la posición 370, una Phe en la posición 405 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 comprende una Ile en la posición 350, una Thr en la posición 370, una Leu en la posición 405 y una Lys en la posición 409.

En una realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Phe en la posición 405, tal como otro distinto de Phe, Arg o Gly en la posición 405; o dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407.

En una realización, el anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento comprende una primera región CH3 que tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y una segunda región CH3 que tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407.

En una realización, el anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento comprende una primera región CH3 que tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y una segunda región CH3 que tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En una realización, el anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento comprende una primera región CH3 que tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y una segunda región CH3 que tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización, dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr, por ejemplo, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp o Cys, en la posición 407. En otra realización, dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr, por ejemplo, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp o Cys, en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 tiene una Tyr en la posición 407 y un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409 y dicha segunda región CH_3 tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene un aminoácido distinto de Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser o Thr, por ejemplo, Leu,

Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp o Cys, en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene una Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, dicha primera región CH3 tiene una Tyr en la posición 407 y una Arg en la posición 409 y dicha segunda región CH3 tiene una Gly, Leu, Met, Asn o Trp en la posición 407 y una Lys en la posición 409.

En otra realización del anticuerpo biespecífico como se define en cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, la primera región CH3 tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 409, y la segunda región CH3 tiene

(i) un aminoácido distinto de Phe, Leu y Met, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr o Cys, en la posición 368, o
(ii) un Trp en la posición 370, o
(iii) un aminoácido distinto de Asp, Cys, Pro, Glu o Gln, por ejemplo, Phe, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Trp, Tyr o Cys, en la posición 399 o
(iv) un aminoácido distinto de Lys, Arg, Ser, Thr o Trp, por ejemplo, Phe, Leu, Met, Ala, Val, Gly, Ile, Asn, His, Asp, Glu, Gln, Pro, Tyr o Cys, en la posición 366.

En una realización, la primera región CH3 tiene una Arg, Ala, His o Gly en la posición 409, y la segunda región CH3 tiene

(i) una Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o
(ii) un Trp en la posición 370, o
(iii) una Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399, o
(iv) una Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met o Tyr en la posición 366.

En una realización, la primera región CH3 tiene una Arg en la posición 409, y la segunda región CH_3 tiene

(i) una Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val o Trp en la posición 368, o
(ii) una Trp en la posición 370, o
(iii) una Phe, His, Lys, Arg o Tyr en la posición 399, o
(iv) una Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln en la posición 366.

En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico comprende una primera y una segunda cadena pesada, en la que cada una de dichas primera y segunda cadenas pesadas comprende al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3, en la que (i) el aminoácido en la posición correspondiente a F405 (de acuerdo con la numeración EU) es L en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 (de acuerdo con la numeración EU) es R en dicha segunda cadena pesada, o (ii) el aminoácido en la posición correspondiente a K409 (de acuerdo con la numeración EU) es R en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a F405 (de acuerdo con la numeración EU) es L en dicha segunda cadena pesada.

Además de las sustituciones de aminoácidos especificadas anteriormente, dichas primera y segunda cadenas pesadas pueden contener sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos adicionales con respecto a secuencias de cadenas pesadas de tipo silvestre.

En una realización adicional, dichos brazos Fab primero y segundo (o dominios constantes de cadena pesada) comprenden, excepto las mutaciones especificadas, una secuencia de CH3 seleccionada independientemente de lo siguiente: (IgG1m(a)) (SEQ ID NO: 96), (IgG1m(f)) (SEQ ID NO: 97), e (IgG1m(ax) (SEQ ID NO: 98).

En una realización, ni dicha primera ni dicha segunda secuencia de Fc comprenden una secuencia Cys-Pro-Ser-Cys en la región bisagra (núcleo).

En una realización adicional, tanto dicha primera como dicha segunda secuencia de Fc comprenden una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra (núcleo).

Métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos.

Se pueden usar métodos tradicionales tales como el hibridoma híbrido y los métodos de conjugación química (Marvin y Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26: 649) en la preparación de los anticuerpos biespecíficos de la invención. La coexpresión en una célula huésped de dos anticuerpos, que consisten en diferentes cadenas pesadas y ligeras, conduce a una mezcla de posibles productos de anticuerpos además del anticuerpo biespecífico deseado, que luego

puede aislarse mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad o métodos similares.
También se pueden usar estrategias que favorezcan la formación de un producto biespecífico funcional tras la coexpresión de diferentes construcciones de anticuerpos, por ejemplo, el método descrito por Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155: 219). La fusión de hibridomas de rata y ratón que producen diferentes anticuerpos conduce a un número limitado de proteínas heterodiméricas debido al emparejamiento preferencial de cadenas pesadas/ligeras restringidas por especies. Otra estrategia para promover la formación de heterodímeros sobre homodímeros es una estrategia de "botón en ojal" en la que se introduce una protuberancia en un primer polipéptido de cadena pesada y una cavidad correspondiente en un segundo polipéptido de cadena pesada, de manera que la protuberancia pueda ser colocada en la cavidad en la interfaz de estas dos cadenas pesadas para promover la formación de heterodímeros y dificultar la formación de homodímeros. Las "protuberancias" se construyen reemplazando pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz del primer polipéptido con cadenas laterales más grandes. Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a las protuberancias en la interfaz del segundo polipéptido reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (patente de los Estados Unidos No. 5,731,168). Los documentos EP1870459 (Chugai) y WO2009089004 (Amgen) describen otras estrategias para favorecer la formación de heterodímeros tras la coexpresión de diferentes dominios de anticuerpos en una célula huésped. En estos métodos, uno o más residuos que forman la interfaz CH3-CH3 en ambos dominios CH3 se reemplazan con un aminoácido cargado de modo que la formación de homodímeros sea electrostáticamente desfavorable y la heterodimerización sea electrostáticamente favorable. El documento WO2007110205 (Merck) describe otra estrategia más, en la que se aprovechan las diferencias entre los dominios CH3 de IgA e IgG para promover la heterodimerización.

Otro método *in vitro* para producir anticuerpos biespecíficos se ha descrito en el documento WO2008119353 (Genmab), en el que se forma un anticuerpo biespecífico mediante intercambio de "brazo Fab" o "media molécula" (intercambio de una cadena pesada y una cadena ligera unida) entre dos anticuerpos monoespecíficos IgG4 o similares a IgG4 tras la incubación en condiciones reductoras. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab que pueden comprender secuencias diferentes.

Un método preferido para preparar anticuerpos biespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1, de la presente invención incluye los métodos descritos en los documentos WO2011131746 y WO2013060867 (Genmab) que comprenden las siguientes etapas:

a) proporcionar un primer anticuerpo que comprende una región Fc, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3;
b) proporcionar un segundo anticuerpo que comprende una segunda región Fc, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3,

en el que el primer anticuerpo es un anticuerpo PD-L1 de acuerdo con la invención y el segundo anticuerpo es un anticuerpo que es capaz de unirse a un epítopo de PD-L1 diferente o a un antígeno diferente, tal como CD3 humano, o viceversa; y
en el que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3;

c) incubar dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo en condiciones reductoras; y
d) obtener dicho anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico PD-L1xCD3.

De manera similar, se proporciona un método para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, que comprende las etapas de:

a) cultivar una célula huésped que produce un primer anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano como se define en el presente documento y purificar dicho primer anticuerpo del cultivo;
b) cultivar una célula huésped que produce un segundo anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a un epítopo de PD-L1 diferente o a un antígeno diferente, por ejemplo, una región de unión a CD3ε humano como se define en el presente documento, purificando dicho segundo anticuerpo del cultivo;
c) incubar dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten una isomerización por enlace disulfuro, y
d) obtener dicho anticuerpo biespecífico.

En una realización, dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo se incuba en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten una isomerización por enlace disulfuro, en la que la interacción heterodimérica entre dicho primer y segundo anticuerpos en el anticuerpo heterodimérico resultante es tal que no se produce intercambio de brazo Fab con GSH 0.5 mM después de 24 horas a 37 °C.

Sin limitarse a la teoría, en la etapa c), los enlaces disulfuro de cadena pesada en las regiones bisagra de los anticuerpos originales se reducen y las cisteínas resultantes son capaces entonces de formar enlaces disulfuro entre cadenas pesadas con residuos de cisteína de otra molécula de anticuerpo original (originalmente con una especificidad

diferente). En una realización de este método, las condiciones reductoras en la etapa c) comprenden la adición de un agente reductor, por ejemplo, un agente reductor seleccionado del grupo formado por: 2-mercaptoetilamina (2-MEA), ditiotreitol (DTT), ditioeritritol (DTE), glutatión, tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), L-cisteína y beta-mercapto-etanol, preferiblemente un agente reductor seleccionado del grupo que consiste en: 2-mercaptoetilamina, ditiotreitol y tris(2-carboxietil)fosfina. En una realización adicional, la etapa c) comprende restaurar las condiciones para que se vuelvan no reductoras o menos reductoras, por ejemplo, mediante la eliminación de un agente reductor, por ejemplo, mediante desalación.

Para este método, cualquiera de los anticuerpos, por ejemplo, pueden usarse los anticuerpos CD3 y PD-L1 descritos anteriormente, incluidos el primer y segundo anticuerpo CD3 y PD-L1, respectivamente, que comprenden una primera y/o segunda región Fc. Los ejemplos de dichas primera y segunda regiones Fc, incluida la combinación de dichas primera y segunda regiones Fc, pueden incluir cualquiera de las descritas anteriormente. En una realización particular, el primer y segundo anticuerpo, por ejemplo, los anticuerpos CD3 y PD-L1, respectivamente, pueden elegirse para obtener un anticuerpo biespecífico como se describe en el presente documento.

En una realización de este método, dichos primer y/o segundo anticuerpos son anticuerpos de longitud completa.

Las regiones Fc del primer y segundo anticuerpo pueden ser de cualquier isotipo, incluidos, entre otros, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una realización de este método, las regiones Fc de dicho primer y segundo anticuerpo son del isotipo IgG1. En otra realización, una de las regiones Fc de dichos anticuerpos es del isotipo IgG1 y la otra del isotipo IgG4. En la última realización, el anticuerpo biespecífico resultante comprende una secuencia de Fc de una IgG1 y una secuencia de Fc de IgG4 y, por lo tanto, puede tener propiedades intermedias interesantes con respecto a la activación de funciones efectoras.

En una realización adicional, una de las proteínas de partida del anticuerpo se ha modificado para que no se una a la Proteína A, permitiendo así separar la proteína heterodimérica de dicha proteína de partida homodimérica pasando el producto sobre una columna de proteína A.

Como se describió anteriormente, las secuencias de la primera y segunda regiones CH3 de los anticuerpos homodiméricos de partida son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3. En los documentos WO2011131746 y WO2013060867 (Genmab) se proporcionan más detalles sobre estas interacciones y cómo se pueden lograr.

En particular, se puede utilizar un anticuerpo biespecífico estable, por ejemplo, se puede obtener un anticuerpo CD3xPD-L1 biespecífico con un alto rendimiento utilizando el método anterior de la invención sobre la base de dos anticuerpos de partida homodiméricos que se unen a PD-L1 y un antígeno diferente o un epítopo diferente de PD-L1, por ejemplo, CD3, respectivamente, y contienen sólo unas pocas mutaciones asimétricas, conservadoras, en las regiones CH3. Las mutaciones asimétricas significan que las secuencias de dichas primera y segunda regiones CH3 contienen sustituciones de aminoácidos en posiciones no idénticas.

Los anticuerpos biespecíficos de la invención también se pueden obtener mediante coexpresión de construcciones que codifican el primer y segundo polipéptido en una única célula. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo biespecífico, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) proporcionar una primera construcción de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende una primera secuencia de Fc y una primera región de unión a antígeno de una primera cadena pesada de anticuerpo, comprendiendo dicha primera secuencia de Fc una primera región CH3,
b) proporcionar una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende una segunda secuencia de Fc y una segunda región de unión a antígeno de una segunda cadena pesada de anticuerpo, comprendiendo dicha segunda secuencia de Fc una segunda región CH3,
en la que las secuencias de dicha primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3, y en la que dicha primera proteína homodimérica tiene un aminoácido distinto de Lys, Leu o Met en la posición 409 y dicha segunda proteína homodimérica tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407,
opcionalmente en la que dichas primera y segunda construcciones de ácido nucleico codifican secuencias de cadena ligera de dichos primer y segundo anticuerpos
c) coexpresar dichas primera y segunda construcciones de ácido nucleico en una célula huésped, y
d) obtener dicha proteína heterodimérica a partir del cultivo celular.

Materiales y métodos para la producción de anticuerpos de la invención.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a materiales y métodos para la producción recombinante de anticuerpos de acuerdo con la invención. Los vectores de expresión adecuados, incluidos promotores, potenciadores, etc., y células huésped adecuadas para la producción de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

Así, en un aspecto, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende:
(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano como se define en el presente documento, y/o

(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano como se define en el presente documento.

En una realización, la construcción de ácido nucleico comprende, además:

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a un epítopo de PD-L1 diferente o un antígeno diferente, por ejemplo, CD3ε humano como se define en el presente documento, y

(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a un epítopo de PD-L1 diferente o un antígeno diferente, por ejemplo, CD3ε humano como se define en el presente documento.

En un aspecto aún adicional, la invención se refiere a un vector de expresión que comprende construcciones de ácido nucleico como se definió en el presente documento anteriormente.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluidos vectores de ácido nucleico cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos y vectores de ácidos nucleicos virales (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo PD-L1 o CD3 está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, que incluye, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe, por ejemplo, en Sykes y Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe, por ejemplo, en los documentos US 6,077,835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño "mínimo" (como se describe, por ejemplo, en Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con Ca3(PO4)2 (como se describe, por ejemplo, en el documento WO200046147, Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y su uso son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5,589,466 y US 5,973,972).

En una realización, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo, por ejemplo, el anticuerpo PD-L1 y/o el anticuerpo CD3 en una célula bacteriana. Ejemplos de tales vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares).

Un vector de expresión también puede ser, o alternativamente, un vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para la expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), y Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)).

Un vector de expresión también puede ser, o alternativamente, un vector adecuado para la expresión en células de mamífero, por ejemplo, un vector que comprende glutamina sintetasa como etiqueta seleccionable, tal como los vectores descritos en Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10:169-175.

Un ácido nucleico y/o vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigir un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica naciente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Dichas secuencias son conocidas en la técnica e incluyen péptidos guía o señal de secreción.

El vector de expresión puede comprender o estar asociado con cualquier promotor, potenciador y otros elementos que faciliten la expresión adecuados. Ejemplos de tales elementos incluyen promotores de expresión fuertes (p. ej., promotor/potenciador de IE de CMV humano, así como promotores de LTR de RSV, SV40, SL3-3, MMTV y VIH), secuencias de terminación de poli (A) efectivas, un origen de replicación para producto plasmático en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como etiqueta seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (p. ej., un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en contraposición a un promotor constitutivo tal como IE de CMV.

En una realización, el vector de expresión que codifica el anticuerpo, por ejemplo, el vector de expresión que codifica

el anticuerpo PD-L1 y/o CD3 puede posicionarse y/o administrarse a la célula huésped o al animal huésped a través de un vector viral.
En un aspecto aún adicional, la invención se refiere a una célula huésped que comprende una o más de las construcciones de ácido nucleico o el vector de expresión especificados en el presente documento anteriormente.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una célula huésped eucariota o procariota recombinante que produce un anticuerpo de la presente invención, tal como un transfectoma.

Los ejemplos de células huésped incluyen células de levadura, bacterianas, vegetales y de mamíferos, tales como células CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 o NS0 o células linfocíticas. Una célula huésped preferida es una célula CHO-K1.

Por ejemplo, en una realización, la célula huésped puede comprender una primera y una segunda construcción de ácido nucleico integradas de forma estable en el genoma celular. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una primera y una segunda construcción de ácido nucleico como se especificó anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo PD-L1 como se define en el presente documento.

Regiones Fc

En algunas realizaciones, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención comprende, además de las regiones de unión al antígeno, una región Fc que consiste en las secuencias Fc de las dos cadenas pesadas.

La primera y segunda secuencias de Fc pueden ser cada una de cualquier isotipo, incluyendo, entre otras, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y pueden comprender una o más mutaciones o modificaciones. En una realización, cada una de las primera y segunda secuencias Fc es del isotipo IgG4 o se deriva del mismo, opcionalmente con una o más mutaciones o modificaciones. En otra realización, cada una de las primera y segunda secuencias Fc es del isotipo IgG1 o se deriva del mismo, opcionalmente con una o más mutaciones o modificaciones. En otra realización, una de las secuencias de Fc es del isotipo IgG1 y la otra del isotipo IgG4, o se deriva de dichos isotipos respectivos, opcionalmente con una o más mutaciones o modificaciones.

En una realización, una o ambas secuencias de Fc tienen una función efectora deficiente. Por ejemplo, la(s) secuencia(s) de Fc pueden ser de un isotipo IgG4 o de un tipo distinto de IgG4, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG3, que ha sido mutada de tal manera que la capacidad de mediar funciones efectoras, como ADCC, se ha reducido o incluso eliminado. Tales mutaciones han sido descritas en Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2): 1129-1138 (2006) y Hezareh M, J Virol.; 75(24): 12161-12168 (2001). En otra realización, una o ambas secuencias de Fc comprenden una secuencia de tipo silvestre de IgG1.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden comprender modificaciones en la región Fc. Cuando un anticuerpo comprende tales modificaciones, puede convertirse en un anticuerpo inerte o no activador. El término "inercia", "inerte" o "no activador" como se usa en el presente documento, se refiere a una región Fc que al menos no es capaz de unirse a ningún receptor de Fcγ, inducir entrecruzamientos de FcR mediada por Fc o inducir entrecruzamiento mediado por FcR de antígenos diana a través de dos regiones Fc de anticuerpos individuales, o no es capaz de unirse a C1q. La inercia de una región Fc de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo CD3 humanizado o quimérico, se prueba ventajosamente usando el anticuerpo en un formato monoespecífico.

Se pueden construir varias variantes para inactivar la región Fc de un anticuerpo para interacciones con receptores Fcγ (gamma) y C1q para el desarrollo de anticuerpos terapéuticos. En el presente documento se describen ejemplos de tales variantes.

Por lo tanto, en una realización del anticuerpo de la invención, dicho anticuerpo comprende una primera y una segunda cadenas pesadas, en la que una o ambas cadenas pesadas están modificadas de modo que el anticuerpo induce la función efectora mediada por Fc en menor medida con respecto a un anticuerpo que es idéntico, excepto que comprende una primera y segunda cadenas pesadas no modificadas. Dicha función efectora mediada por Fc puede medirse determinando la expresión de CD69 mediada por Fc, uniéndose a receptores de Fcγ, uniéndose a C1q o mediante la inducción de entrecruzamiento de FcR mediado por Fc.

En una de dichas realizaciones, las secuencias constantes de la cadena pesada se han modificado de modo que dicho anticuerpo reduzca la expresión de CD69 mediada por Fc en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % o 100 % en comparación con un anticuerpo de tipo silvestre (no modificado), en el que dicha expresión de CD69 mediada por Fc se determina en un ensayo funcional basado en PBMC, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 3 del documento WO2015001085.

En otra realización de este tipo, las secuencias constantes de las cadenas pesada y ligera se han modificado de modo que la unión de C1q a dicho anticuerpo se reduce en comparación con un anticuerpo no modificado en al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos 95 %, al menos 97 % o 100 %, en el que la unión de C1q se determina mediante ELISA.

En otra realización, el anticuerpo comprende una región Fc que se ha modificado de modo que dicho anticuerpo media una proliferación reducida de células T mediada por Fc en comparación con un anticuerpo no modificado en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % o 100 %, en el que dicha proliferación de células T se mide en un ensayo funcional basado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Por lo tanto, se pueden modificar los aminoácidos en la región Fc que desempeñan un papel dominante en las interacciones con los receptores C1q y Fcy.

Ejemplos de posiciones de aminoácidos que pueden modificarse, por ejemplo, en un anticuerpo de isotipo IgG1, incluyen las posiciones L234, L235 y P331. Las combinaciones de los mismos, como L234F/L235E/P331S, pueden causar una profunda disminución en la unión a CD64, CD32, CD16 y C1q humanos.

Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en al menos una posición correspondiente a L234, L235 y P331, puede ser A, A y S, respectivamente (Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1): 16-26; Oganesyan et al., 2008, Acta Cryst (D64): 700-4. Además, las sustituciones de aminoácidos L234F y L235E pueden dar como resultado regiones Fc con interacciones anuladas con receptores Fcγ y C1q (Canfield et al., 1991, J. Exp. Med. (173): 1483-91; Duncan et al., 1988, Nature (332): 738-40). Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a L234 y L235 pueden ser F y E, respectivamente. Una sustitución del aminoácido D265A puede disminuir la unión a todos los receptores Fcy y prevenir la ADCC (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276): 6591-604). Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en la posición correspondiente a D265 puede ser A. La unión a C1q se puede anular mutando las posiciones D270, K322, P329 y P331. La mutación de estas posiciones a D270A o K322A o P329A o P331A puede hacer que el anticuerpo tenga una actividad CDC deficiente. Idusogie EE, et al., 2000, J Immunol. 164: 4178-84). Por lo tanto, en una realización, los aminoácidos en al menos una posición correspondiente a D270, K322, P329 y P331 pueden ser A, A, A y A, respectivamente.

Un enfoque alternativo para minimizar la interacción de la región Fc con los receptores Fcy y C1q es mediante la eliminación del sitio de glicosilación de un anticuerpo. Mutando la posición N297 a, por ejemplo, Q, A o E eliminan un sitio de glicosilación que es crítico para las interacciones del receptor gamma IgG-Fc. Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a N297 puede ser G, Q, A o E (Leabman et al., 2013, MAbs; 5(6): 896-903). Otro enfoque alternativo para minimizar la interacción de la región Fc con los receptores Fcy se puede obtener mediante las siguientes mutaciones; P238A, A327Q, P329A o E233P/L234V/L235A/G236del (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276): 6591-604).

Alternativamente, las subclases humanas IgG2 e IgG4 se consideran naturalmente comprometidas en sus interacciones con los receptores C1q y Fc gamma, aunque se informaron interacciones con los receptores Fcy (Parren et al., 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546; Bruhns et al., 2009, Blood 113: 3716-3725). Se pueden realizar mutaciones que anulen estas interacciones residuales en ambos isotipos, lo que da como resultado una reducción de los efectos secundarios no deseados asociados con la unión de FcR. Para IgG2, estos incluyen L234A y G237A, y para IgG4, L235E. Por lo tanto, en una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a L234 y G237 en una cadena pesada de IgG2 humana puede ser A y A, respectivamente. En una realización, el aminoácido en una posición correspondiente a L235 en una cadena pesada de IgG4 humana puede ser E.

Otros enfoques para minimizar aún más la interacción con los receptores Fcy y C1q en los anticuerpos IgG2 incluyen los descritos en el documento WO2011066501 y Lightle, S., et al., 2010, Protein Science (19): 753-62.

La región bisagra del anticuerpo también puede ser importante con respecto a las interacciones con los receptores Fcy y el complemento (Brekke et al., 2006, J Immunol 177: 1129-1138; Dall'Acqua WF, et al., 2006, J Immunol 177: 1129-1138). En consecuencia, las mutaciones o la eliminación de la región bisagra pueden influir en las funciones efectoras de un anticuerpo.

En consecuencia, en una realización, el anticuerpo comprende una primera y una segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina, en la que en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas de inmunoglobulina uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana no son L, L, D, N y P, respectivamente.

En una realización, tanto en la primera como en la segunda cadena pesada, uno o más aminoácidos en la posición correspondiente a las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L, L, D, N y P, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en la segunda cadena pesada, el aminoácido en la posición

correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana, no es D.

De este modo, en una realización, tanto en dicha primera como en la segunda cadena pesada, el aminoácido en la posición correspondiente a la posición D265 en una cadena pesada de IgG1 humana se selecciona del grupo que consiste en: A y E.

En una realización adicional, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana, no son L y L, respectivamente.

En una realización particular, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana son F y E, respectivamente.

En una realización, tanto en dicha primera como en la segunda cadena pesada, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana son F y E, respectivamente.

En una realización particular, en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E y A, respectivamente.

En una realización particularmente preferida, tanto en dicha primera como en la segunda cadena pesada, los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana son F, E y A, respectivamente.

En una realización adicional particularmente preferida, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera y una segunda cadena pesada, en la que las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU tanto de la primera cadena pesada como la segunda cadena pesada son F y E, respectivamente, y en la que (i) la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es L, y la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es R, o (ii) la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es R, y la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es L.

En una realización adicional particularmente preferida, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera y una segunda cadena pesada, en la que las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU tanto de la primera cadena pesada como de la segunda cadena pesada son F, E y A, respectivamente, y en la que (i) la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es L, y la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es R, o (ii) la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es R, y la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es L.

Las variantes de anticuerpos que tienen la combinación de tres sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y D265A y además la mutación K409R o F405L se denominan en el presente documento con el sufijo "FEAR" o "FEAL", respectivamente.

En el presente documento, huCD3-H1L1 se refiere al anticuerpo anti-CD3 SP34 humanizado que tiene secuencias de VH y VL como se establece en las SEQ ID NOs: 25 y 29.

En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende:

(i) un anticuerpo de media molécula derivado de IgG1-huCD3-H1L1-FEAL, y un anticuerpo de media molécula derivado de IgG1-PDL1-338-FEAR, IgG1-PDL1-511-FEAR o IgG1-PDL1-547-FEAR, o
(ii) un anticuerpo de media molécula derivado de IgG1-huCD3-H1L1-FEAR, y un anticuerpo de media molécula derivado de y un anticuerpo de media molécula derivado de IgG1-PDL1-338-FEAL, IgG1-PDL1-511-FEAL o IgG1-PDL1-547-FEAL.

En una realización adicional, la primera cadena pesada o media molécula comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 90 y la segunda cadena pesada comprende la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 89.

En una realización adicional de la invención, uno o ambos anticuerpos que forman parte del anticuerpo biespecífico se han modificado para reducir o aumentar la unión al receptor Fc neonatal (FcRn) con el fin de manipular la vida media en suero del anticuerpo biespecífico. Las técnicas para aumentar o reducir la vida media en suero son bien

conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Dall'Acqua et al. 2006, J. Biol. Chem., 281: 23514-24; Hinton et al. 2006, J. Immunol., 176: 346-56; y Zalevsky et al. 2010 Nat. Biotechnol., 28: 157-9.

Conjugados

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona anticuerpos que están unidos o conjugados con una o más fracciones terapéuticas, tales como una citoquina, un inmunosupresor, una molécula inmunoestimulante y/o un radioisótopo. Estos conjugados se denominan en el presente documento "inmunoconjugados" o "conjugados de fármacos". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas".

En una realización, la primera y/o segunda secuencia de Fc está conjugada con un fármaco o un profármaco o contiene un grupo aceptor del mismo. Dicho grupo aceptor puede, por ejemplo, ser un aminoácido no natural.

Composiciones

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un anticuerpo de la presente invención o una combinación de diferentes anticuerpos de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Una composición farmacéutica de la presente invención puede, por ejemplo, incluir diluyentes, rellenos, sales, tampones, detergentes (p. ej., un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (p. ej., azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, fijadores de tejidos, solubilizantes y/o u otros materiales adecuados para su inclusión en una composición farmacéutica.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardadores de la absorción adecuados y similares que sean fisiológicamente compatibles con un anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo, y/o diversos tampones. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, utilizando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y utilizando tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro de sodio en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden mejorar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar con vehículos que protegerán el anticuerpo contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables y biocompatibles tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solos o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, por ejemplo, como se enumera anteriormente, según sea necesario, seguido de microfiltración para esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás

ingredientes necesarios, por ejemplo, de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, ejemplos de métodos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente filtrada de forma estéril.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se está empleando. la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

La composición farmacéutica se puede administrar mediante cualquier vía y modo adecuados. En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral. "Administrado por vía parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

En una realización, esa composición farmacéutica se administra mediante inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Usos

En un aspecto, la invención se refiere al anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, o la composición farmacéutica según se divulga en el presente documento, para su uso como medicamento.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, o a la composición farmacéutica según se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad que comprende administrar una cantidad eficaz de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, o la composición farmacéutica según se divulga en el presente documento a un sujeto que lo necesita.

En particular, los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención pueden ser útiles en entornos terapéuticos en los que se desea el direccionamiento específico y la destrucción mediada por células T de células que expresan PD-L1, y pueden ser más eficientes en comparación con un anticuerpo anti-PD-L1 regular en determinadas indicaciones y entornos.

Los anticuerpos de la invención también tienen utilidad adicional en la terapia y el diagnóstico de una variedad de enfermedades relacionadas con PD-L1. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden usar para provocar *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: para inhibir el crecimiento y/o la diferenciación de una célula que expresa PD-L1; para matar una célula que expresa PD-L1; para mediar en la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa PD-L1 en presencia de células efectoras humanas; para mediar CDC de una célula que expresa PD-L1 en presencia de complemento; para mediar en la apoptosis de una célula que expresa PD-L1; y/o para inducir la translocación en balsas lipídicas tras la unión de PD-L1.

En un aspecto, la invención se refiere al anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, o a la composición farmacéutica según se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, o a la composición farmacéutica según se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento de la enfermedad cancerosa caracterizada por la presencia de tumores sólidos.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento, o a la composición farmacéutica según se divulga en el presente documento para su uso en el tratamiento de enfermedades cancerosas seleccionadas del grupo que consiste en: melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, timoma y carcinoma tímico,

cáncer de cerebro, glioma, carcinoma adrenocortical, cáncer de tiroides, otros cánceres de piel, sarcoma, mieloma múltiple, leucemia, linfoma, síndromes mielodisplásicos, cáncer de ovario, cáncer de endometriosis, cáncer de próstata, cáncer de pene, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, carcinoma de células de Merkel y mesotelioma.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las realizaciones divulgadas en el presente documento para la fabricación de un medicamento, tal como un medicamento para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, una enfermedad cancerosa caracterizada por la presencia de tumores sólidos o una enfermedad cancerosa seleccionada del grupo que consiste en: melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer de cabeza y cuello.

La presente invención también se refiere a un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una o más células tumorales que expresan PD-L1, que comprende la administración, a un individuo que lo necesita, de un anticuerpo de la presente invención.

La presente invención también se refiere a un método para tratar el cáncer, que comprende

a) seleccionar un sujeto que padece un cáncer que comprende células tumorales que expresan PD-L1, y
b) administrar al sujeto el anticuerpo de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención.

Los regímenes de dosificación en los métodos de tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de dosificación.

Las dosis eficaces y los regímenes de dosificación para los anticuerpos dependen de la enfermedad o afección a tratar y pueden ser determinados por los expertos en la técnica. Un intervalo ejemplar, no limitante, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención es aproximadamente 0.001-10 mg/kg, tal como aproximadamente 0.001-5 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0.001-2 mg/kg, tal como aproximadamente 0.001-1 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0.001, aproximadamente 0.01, aproximadamente 0.1, aproximadamente 1 o aproximadamente 10 mg/kg. Otro intervalo ejemplar, no limitante, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención es aproximadamente 0.1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-50 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0.1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0.1-10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.3, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5 o aproximadamente 8 mg/kg.

Un médico o veterinario con experiencia normal en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar a administrar dosis del anticuerpo empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un anticuerpo de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. La administración puede, por ejemplo, ser parenteral, tal como, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea. En una realización, los anticuerpos se pueden administrar mediante infusión en una dosis semanal calculada en mg/m^2. Tales dosis pueden, por ejemplo, basarse en las dosis de mg/kg proporcionadas anteriormente de acuerdo con lo siguiente: dosis (mg/kg) × 70: 1.8. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse mediante infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. En una realización, los anticuerpos pueden administrarse mediante infusión lenta y continua durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.

En una realización, los anticuerpos se pueden administrar en una dosis semanal calculada como una dosis fija hasta 8 veces, tal como de 4 a 6 veces cuando se administra una vez a la semana. Dicho régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. Dichas dosis fijas pueden basarse, por ejemplo, en las dosis de mg/kg proporcionadas anteriormente, con una estimación de peso corporal de 70 kg. La dosis se puede determinar o ajustar midiendo la cantidad de anticuerpo de la presente invención en la sangre tras la administración, por ejemplo, tomando una muestra biológica y usando anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a la región de unión al antígeno del antígeno PD-L1 de los anticuerpos de la presente invención.

En una realización, los anticuerpos se pueden administrar como terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

También se puede administrar un anticuerpo de forma profiláctica para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de un evento en la progresión del cáncer y/o reducir el riesgo de recurrencia cuando un cáncer está en remisión.

Los anticuerpos de la invención también se pueden administrar en terapia combinada, es decir, combinados con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección que se va a tratar. Por consiguiente, en una realización, el medicamento que contiene anticuerpos se combina con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente citotóxico, quimioterapéutico o antiangiogénico.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

La presente invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos PD-L1

Inmunización de animales OmniRat y generación de hibridomas.

La inmunización y la generación de hibridomas se realizaron en Aldevron GmbH (Friburgo, Alemania). Se clonó un ADNc que codifica el aminoácido 19-238 de PD-L1 humano en plásmidos de expresión patentados por Aldevron. Se inmunizaron grupos de animales OmniRat (ratas transgénicas que expresan un repertorio diversificado de anticuerpos con idiotipos completamente humanos; Ligand Pharmaceuticals Inc., San Diego, EE. UU.) mediante la aplicación intradérmica de partículas de oro recubiertas de ADN utilizando un dispositivo portátil para bombardeo de partículas ("pistola genética"). La expresión en la superficie celular en células HEK transfectadas transitoriamente se confirmó con un anticuerpo anti-PD-L1 basado en MPDL3280A de Genentech. Se recogieron muestras de suero después de una serie de inmunizaciones y se analizaron en citometría de flujo en células HEK transfectadas transitoriamente con los plásmidos de expresión antes mencionados. Se aislaron células productoras de anticuerpos y se fusionaron con células de mieloma de ratón (Ag8) de acuerdo con procedimientos estándar. Los hibridomas que producen anticuerpos específicos para PD-L1 se identificaron mediante cribado en el mismo ensayo descrito anteriormente. Se prepararon sedimentos celulares de células de hibridomas positivas utilizando un agente de protección de ARN (RNAlater, ThermoFisher Scientific, cat. no. AM7020) y se procesaron adicionalmente para la secuenciación de los dominios variables de los anticuerpos.

Análisis de secuencia de los dominios variables del anticuerpo PD-L1 y clonación en vectores de expresión

Se preparó ARN total a partir de 0.2 a 5 x 10^6 células de hibridoma y se preparó ADN complementario 5'-RACE (ADNc) a partir de ARN total, usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las regiones codificantes de VH y VL se amplificaron mediante PCR y se clonaron directamente, en marco, en vectores de expresión pOMTG1f-FEAR-LIC (IgG1 humana) y pEFC33D-Kappa (Kappa humana) o pOMTL-LIC (Lambda humana), mediante clonación independiente de la ligadura (Aslanidis, C. y PJ de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18(20): 6069-74). En estos plásmidos, las secuencias de anticuerpos se expresan utilizando un promotor CMV. Para cada anticuerpo, se secuenciaron 8 clones de VL y 8 clones de VH. Las secuencias de CDR se definieron de acuerdo con las definiciones IMGT [Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999; Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)]. Se seleccionaron clones con un marco de lectura abierto (ORF) correcto para su posterior estudio y expresión. Los productos de PCR de LEE de todas las combinaciones de cadenas pesadas y cadenas ligeras que se encontraron por cultivo de hibridoma se coexpresaron transitoriamente en células Expi293F usando ExpiFectamine. Por hibridoma, se seleccionó como candidato principal el par HC/LC que mostró la mejor unión en una evaluación homogénea de dosis-respuesta.

Se seleccionaron tres anticuerpos PD-L1, numerados 338, 511 y 547, respectivamente, para experimentación adicional. Las secuencias de sus regiones variables se muestran en el Listado de secuencias del presente documento.

Para el anticuerpo IgG1-PDL1-511-FEAR se generó una variante con mutación puntual en los dominios variables para eliminar un residuo de cisteína que potencialmente podría generar puentes disulfuro no deseados: IgG1-PDL1-511-FEAR-LC33S. Este mutante fue generado por síntesis de genes (Geneart).

PCR de LEE

Se produjeron elementos de expresión lineal (de LEE) amplificando el fragmento que contiene el promotor de CMV, las regiones codificantes de HC o LC y la señal de poli A que contiene elementos de los plásmidos de expresión. Para esto las regiones se amplificaron utilizando la ADN polimerasa Accuprime Taq (Life Technologies) y los cebadores CMVPf(BsaI)2 y TkpA(BsaI)r, realizando 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 (LC) o 3 (HC) minutos a 68 °C, utilizando material miniprep de plásmido diluido 50x, como plantilla de ADN.

Expresión transitoria de fragmentos de LEE en células Expi293F

Para la expresión de LEE de Ab, se mezclaron y transfectaron 1.11 µL de la mezcla de reacción de PCR de LEE de HC y 1.11 µL de la mezcla de reacción de PCR de LC y se transfectaron en células Expi293F en un volumen total de 125 µL usando ExpiFectamine 293 como reactivo de transfección, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), utilizando como recipiente placas de 96 pocillos.

Expresión de anticuerpos

Los anticuerpos se expresaron como IgG1,Kappa (para 338) o IgG1,Lambda (para 511 y 547). Las mezclas de ADN plásmido que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos se expresaron transitoriamente utilizando la plataforma de expresión Expi293F (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) esencialmente como lo describe el fabricante.

Ensayo de unión homogénea

Se ensayó la unión de los anticuerpos en un cribado homogéneo de dosis-respuesta utilizando células CHO transfectadas con PDL1, PDL1mm o PDL1Mf (véase también el Ejemplo 2). Se utilizaron células CHO no transfectadas como control negativo.

Se mezclaron células (2.5 x 10^5 células/mL) con IgG antihumana de cabra Alexa 647, específica del fragmento Fcy (0.2 µg/mL; Jackson ImmunoResearch Laboratories, 109-605-098). Se prepararon diluciones en serie de anticuerpos de prueba y de control (intervalo de 0.001 a 3 µg/mL en etapas de dilución doble) y se agregaron 2 µL de dilución de anticuerpo a 5 µL de la mezcla de células/conjugado en placas de 1536 pocillos (Greiner, 789866). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 9 horas y después de lo cual se determinó la intensidad de la fluorescencia utilizando un citómetro de escaneo láser ImageXpress Velos (Molecular Devices).

Purificación de anticuerpos

Se filtró el sobrenadante del cultivo sobre filtros sin salida de 0.2 µm, se cargó en columnas MabSelect SuRe de 5 mL (GE Healthcare) y se eluyó con citrato de sodio-NaOH 0.1 M, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9 y se dializó durante la noche con Na_2HPO_4 8.7 mM, NaH_2PO_4 1.8 mM, NaCl 140.3 mM, pH 7.4 (B. Braun o GE Healthcare). Alternativamente, después de la purificación, el eluato se cargó en una columna de desalación HiPrep y el anticuerpo se intercambió por un tampón Na_2HPO_4 8.7 mM, NaH_2PO_4 1.8 mM, NaCl 140.3 mM, pH 7.4 (B. Braun o GE Healthcare). Después de la diálisis o el intercambio de tampón, las muestras se filtraron de forma estéril sobre filtros sin salida de 0.2 µm. La pureza se determinó mediante CE-SDS utilizando un LabChip GXII (Caliper Life Sciences, MA) y la concentración de IgG se midió utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Isogen Life Science, Maarssen, Países Bajos). Los anticuerpos purificados se almacenaron a 4 °C.

Ejemplo 2: Generación de material de cribado

Construcciones de expresión para PD-L1

Se generaron las siguientes construcciones con codones optimizados para la expresión de PD-L1 de longitud completa: PD-L1 humano (Homo sapiens) (GenBank acceso no. NP_054862), PD-L1 de mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (GenBank acceso no. XP_005581836), ratón (Mus musculus) PD-L1 (GenBank acceso no. NP_068693).

Además, se generó la siguiente construcción con codones optimizados para el ECD de PD-L1: el dominio extracelular (ECD) de PD-L1 humano (aa 1-238) con una etiqueta His del terminal C y una etiqueta C (PDLoneECDHisCtag).

Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para la clonación y una secuencia Kozak óptima (GCCGCCACC) [Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208]. Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pMA (Geneart).

Construcción de expresión para PD-L2

De manera similar, se generó la siguiente construcción con codones optimizados para la expresión de PD-L2 humano de longitud completa: PD-L2 humano (Homo sapiens) (GenBank acceso no. NP_079515)

Expresión en células CHO-S.

Se transfectaron transitoriamente células CHO-S con el vector pMA que contenía la secuencia codificante para el PD-L1 humano completo, el mono cynomolgus completo y el ratón completo, respectivamente.

Purificación de PD-L1 etiquetado con His

Se expresó PDLoneECDHisCtag en células HEK-293F. La etiqueta His permite la purificación con cromatografía de afinidad por metales inmovilizados. En este proceso se carga un quelante fijado sobre la resina cromatográfica con cationes Co^{2+}. Los sobrenadantes que contenían proteína etiquetada con His se incubaron con la resina en modo

discontinuo (es decir, solución). La proteína etiquetada con His se une fuertemente a las perlas de resina, mientras que otras proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo no se unen o se unen débilmente en comparación con las proteínas etiquetadas con His. Después de la incubación, las perlas se recuperan del sobrenadante y se empaquetan en una columna. La columna se lava para eliminar las proteínas débilmente unidas. Las proteínas etiquetadas con His fuertemente unidas se eluyen luego con un tampón que contiene imidazol, que compite con la unión de His a Co^{2+}. El eluyente se elimina de la proteína mediante intercambio de tampón en una columna de desalación.

Ejemplo 3: Anticuerpo CD3 humanizado para la generación de anticuerpos biespecíficos CD3xPDL1

La generación del anticuerpo humanizado lgG1-huCD3-H1L1 se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2015001085. El anticuerpo huCD3-H1L1-FEAL es una variante del mismo que tiene las siguientes sustituciones: L234F, L235E, D265A y F405L, como se describió anteriormente en el presente documento.

Ejemplo 4: Generación de anticuerpos biespecíficos mediante intercambio del brazo Fab inducido por 2-MEA

Se generaron anticuerpos lgG1 biespecíficos mediante intercambio del brazo Fab en condiciones reductoras controladas. La base de este método es el uso de dominios CH3 complementarios, que promueven la formación de heterodímeros en condiciones de ensayo específicas, como se describe en el documento WO2011/131746. Las mutaciones F405L y K409R (numeración EU) se introdujeron en los anticuerpos relevantes para crear pares de anticuerpos con dominios CH3 complementarios.

Para generar anticuerpos biespecíficos, los dos anticuerpos complementarios originales, cada anticuerpo en una concentración final de 0.5 mg/mL, se incubaron con 2-mercaptoetilamina-HCl (2-MEA) 75 mM en un volumen total de 100 µL de TE a 31 °C durante 5 horas. La reacción de reducción se detuvo eliminando el agente reductor 2-MEA usando columnas de centrifugación (filtros centrífugos Microcon, 30k, Millipore) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

En los ejemplos se usaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos CD3

lgG1-huCD3-H1L1-FEAL (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 29, respectivamente)
bslgG1-huCD3-H1L1-FEALxb12-FEAR es un anticuerpo biespecífico que utiliza como segundo brazo el anticuerpo b12 que es un anticuerpo específico de gp120 (Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230(3): 812-23).

Anticuerpos PDL1 y anticuerpos biespecíficos CD3xPDL1

lgG1-338-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 5, respectivamente)

lgG1-338-F405L

bslgG1- huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR

bslgG1- b 12 -FEALx338-FEAR

lgG1-511-LC33S-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 15, respectivamente)

lgG1-511-F405L-LC33S

bslgG1- huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR

bslgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR

lgG1-547-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 18 y la SEQ ID NO: 22, respectivamente)

lgG 1-547-F405L

bslgG1- huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR

bslgG1- b 12-FEALx54 7-FEAR

IgG1-321-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 32 y la SEQ ID NO: 36, respectivamente)
IgG1-421-LC91S-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 46 y la SEQ ID NO: 50, respectivamente)

IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 53 y la SEQ ID NO: 57, respectivamente)

IgG1-625-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 106 y la SEQ ID NO: 110, respectivamente)

IgG1-632-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 67 y la SEQ ID NO: 71, respectivamente)

IgG1-516-FEAR (que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 60 y la SEQ ID NO: 64, respectivamente)

IgG1-MPDL3280A-FEAR (basado en el anticuerpo PDL1 MPDL3280A de Genentech; que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 74 y la SEQ ID NO: 78, respectivamente) IgG1-MPDL3280A-K409R

IgG1-MEDI4736-FEAR (basado en el anticuerpo PDL1 MEDI4736 de MedImmune; que tiene las secuencias de VH y VL expuestas en la SEQ ID NO: 81 y la SEQ ID NO: 85, respectivamente) IgG 1-M EDI4736-F405L

Ejemplo 5: Unión de anticuerpos PD-L1 o anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 o b12xPD-L1 a células tumorales

Unión de anticuerpos PD-L1 y anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 y b12xPD-L1 a las líneas celulares tumorales humanas SK-MES-1 (carcinoma de células escamosas de pulmón; ATCC; cat. no. HTB-58) MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama; ATCC; Cat. no. HTB-26), PC-3 (adenocarcinoma de próstata; ATCC; Cat. no. CRL-1435) y HELA (adenocarcinoma de cuello uterino; ATCC; Cat. no. CCL-2) se analizaron por citometría de flujo.

Se incubaron células (3-5 x 10^4 células/pocillo) en placas de fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno (Greiner bio-one, cat. no. 650101) con diluciones en serie de anticuerpos (intervalo de 0.0001 a 10 µg/mL en etapas de dilución de 5 veces) en 50 µL de PBS/BSA al 0.1 %/azida al 0.02 % (tampón de tinción) a 4 °C durante 30 min.

Después de lavar dos veces en tampón de tinción, las células se incubaron en 50 µL de anticuerpo secundario a 4 °C durante 30 min. Como anticuerpo secundario, se utilizó F(ab')z de IgG antihumana de cabra conjugado con R-ficoeritrina (PE) (cat. no. 109-116-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) diluido 1:500 en tampón de tinción, para todos los experimentos. A continuación, las células se lavaron dos veces en tampón de tinción, se resuspendieron en 20 µL de tampón de tinción y se analizaron en un analizador iQue (Intellicyt Corporation, EE. UU.). Las curvas de unión se analizaron mediante regresión no lineal (dosis-respuesta sigmoidal con pendiente variable) utilizando el software GraphPad Prism V75.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Se realizó citometría de flujo cuantitativa (QIFIKIT®, Dako; cat. no. K0078) como se describe (Poncelet y Carayon, 1985, J. Immunol. Meth. 85: 65-74), para cuantificar la expresión diana en la membrana plasmática de células MDA-MB-231, PC-3 y HELA, y para determinar el número de moléculas de PDL1 unidas. Se determinó que las líneas celulares tienen la siguiente densidad antigénica PD-L1 (ABC, capacidad de unión de anticuerpos):

- SK-MES-1: aprox. 30,000 ABC/célula
- MDA-MB-231: aprox. 21,000 ABC/célula
- PC-3: aprox. 6,000 ABC/célula
- Células HELA: aprox. 2,000 ABC/célula.

Unión a células MDA-MB-231

La Figura 1 muestra que bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR (A), bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR (D), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR (B) y bsIgG1-b12-FEALx547- FEAR (E) mostraron una unión dependiente de la dosis a las células MDA-MB-231, con una unión máxima más alta que los anticuerpos PD-L1 monoespecíficos bivalentes IgG1-338-FEAR e IgG1-547-FEAR. La unión máxima de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR (C) y bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR (F) fue menor que la del anticuerpo PD-L1 bivalente monoespecífico IgG1-511-LC33S-FEAR.

Unión a células PC-3

La Figura 2 muestra que bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR (A), bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR (D), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR (B) y bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR (E) mostraron una unión dependiente de la dosis

a las células PC3. La unión máxima de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR (C) y bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR (F) fue menor que la del anticuerpo PD-L1 bivalente monoespecífico IgG1-511-LC33S-FEAR.

Unión a células HELA

La Figura 3 muestra que bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR (A) y bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR (B) mostraron una unión dependiente de la dosis a células HELA. La unión máxima de los anticuerpos PD-L1 bivalentes monoespecíficos IgG1-338-FEAR e IgG1-547-FEAR no se pudo determinar en el intervalo de concentración utilizado. (C) bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR no se unieron a las células HELA.

Unión a células SK-MES-1

La Figura 4 muestra que bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR (A) y bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR (B) mostraron una unión dependiente de la dosis a células SK-MES-1, con una unión máxima mayor que la de los anticuerpos PD-L1 bivalentes monoespecíficos IgG1-338-FEAR e IgG1-547-FEAR. La unión máxima de bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR (C) fue menor que la del anticuerpo PD-L1 bivalente monoespecífico IgG1-511-LC33S-FEAR.

Ejemplo 6: Unión a PD-L2 humano

Para mostrar la unión específica a PD-L1 y no a PD-L2 humano, la unión de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR e IgG1-338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR e IgG1-547-FEAR y de bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR a células CHO que expresan PD-L2 humano se determinó mediante citometría de flujo usando un método como se describió anteriormente. Se utilizó como control positivo un anticuerpo específico de PD-L2 conjugado con PE (Miltenyi, clon MIH18; cat. no. 130-098-651). Ninguno de los anticuerpos analizados se unió a las células CHO-PD-L2.

Ejemplo 7: Unión de anticuerpos PD-L1 o anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 o b12xPD-L1 a PD-L1 de cynomolgus

La unión a células CHO que expresan PD-L1 de cynomolgus se determinó mediante citometría de flujo usando un método como se describió anteriormente. La Figura 5 muestra que bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR (A), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR (B), bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR (C), bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR (D), bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR (E) y bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR (F), mostraron una unión dependiente de la dosis a células CHO que expresan PD-L1 de cynomolgus, con una unión máxima mayor que anticuerpos PD-L1 monoespecíficos bivalentes IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR.

Ejemplo 8: Determinación de la afinidad de PD-L1 humano y de cynomolgus usando interferometría de biocapa

En un primer conjunto de experimentos, las afinidades por la proteína PD-L1 humana expresada de forma recombinante se determinaron usando interferometría de biocapa (BLI) en un instrumento Octet HTX (ForteBio). Se cargaron biosensores de captura de Fc de IgG antihumana (AHC) (ForteBio) durante 900 s con anticuerpos (1 µg/mL). Después de una línea de base (100 s), se determinó la asociación (1000 s) y la disociación (2000 s) de PDLoneECDHisCtag en diluyente de muestra (ForteBio), utilizando un intervalo de concentración de 2.67 µg/mL-0.14 µg/mL (100 nM-1.56 nM) con etapas de dilución de 2 veces. El experimento se llevó a cabo agitando a 1000 rpm a 30 °C. Los datos se analizaron con el software de análisis de datos v9.0.0.12 (ForteBio) utilizando el modelo 1:1 y un ajuste completo global con un tiempo de asociación de 1000 s y un tiempo de disociación de 200 o 1000 s. Los rastros de datos se corrigieron restando una referencia de tampón, el eje Y se alineó con los últimos 10 s de la línea de base y se aplicó la corrección entre etapas y el filtrado de Savitzky-Golay. Se excluyeron del análisis los rastros de datos con una respuesta <0.05 nm. Por defecto, se utilizó el ajuste utilizando un tiempo de disociación de 1000 s. Se utilizó un tiempo de disociación de 200 s para IgG1-511-FEAR-LC33S, basándose en el valor R^2 y la inspección visual del ajuste.

La Tabla 1 muestra los resultados.

Tabla 1: Afinidades de unión de anticuerpos PD-L1 monoespecíficos y bivalentes para PD-L1 humano de acuerdo con lo determinado por interferometría de bicapa

Anticuerpo	Constante de asociación ka (1/Ms)	Constante de disociación kd (1/s)	K_D (M)
IgG1-338-FEAR	7.3E+05	6.4E-05	8.8E-11
IgG1-547-FEAR	1.2E+06	3.6E-05	2.9E-11
IgG1-511-LC33S-FEAR	1.2E+06	4.5E-03	3.8E-09

En un segundo conjunto de experimentos (n=3), se compararon las afinidades de los anticuerpos de PD-L1 contra PD-L1 humano y de cynomolgus, determinadas usando BLI. La configuración experimental fue la descrita anteriormente, con la excepción de

- El tiempo de carga de los biosensores AHC con anticuerpos fue de 600 s;
- La línea de base fue 300 s;
- Además de PDLoneECD-HisCtag (PD-L1 humano, peso molecular teórico de 29 kDa), se utilizó la proteína PD-L1/B7-H1 de cynomolgus de (Acro Biosystems, cat. no. PD1-C52H4-100, peso molecular teórico de 27.1 kDa) como antígeno;
- El intervalo de concentración del antígeno fue de 0.156 -10 nM (en el primer experimento) o de 0.39 - 25 nM (en el segundo y tercer experimento).

La Tabla 2 muestra los resultados (promedio de 3 experimentos). Las afinidades de unión de IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR para PD-L1 humano estuvieron en el mismo intervalo que se muestra en la Tabla 1, con una desviación probablemente debida a variaciones en las condiciones del ensayo. Las afinidades de unión de estos anticuerpos para PD-L1 de cynomolgus fueron muy similares a las del PD-L1 humano. También se determinaron las afinidades de unión de IgG1-MEDI4738-FEAR e IgG1-MPDL3280A-FEAR. IgG1-MEDI4738-FEAR mostró una afinidad de unión similar por PD-L1 humano y de cynomolgus. IgG1-MEDI4738-FEAR mostró una gran diferencia en la afinidad de unión, con una afinidad promedio de 19.7 menor (KD más alta) por PD-L1 de cynomolgus que por PD-L1 humano.

Tabla 2: Afinidades de unión (promedio de 3 experimentos independientes) de anticuerpos PD-L1 monoespecíficos y bivalentes para PD-L1 humano y de cynomolgus de acuerdo con lo determinado por interferometría de biocapa.

Anticuerpo	Especie de PD-L1	Constante de asociación k_a (1/Ms)	Constante de disociación k_d (1/s)	K_D (M)	Diferencia de veces de K_D
IgG1-338-FEAR	Humana	8.0E+05	2.5E-04	3.1E-10	2.3
	Cynomolgus	3.9E+05	2.8E-04	7.3E-10	
IgG1-547-FEAR	Humana	9.7E+05	1.1E-04	1.2E-10	2.3
	Cynomolgus	4.4E+05	1.2E-04	2.7E-10	
IgG1-511-LC33S-FEAR	Humana	9.6+05	4.8E-03	5.1E-09	2.3
	Cynomolgus	4.5+E05	5.2E-03	1.2E-08	
IgG1-MEDI4738-FEAR	Humana	8.8E+05	3.3E-04	3.7E-10	2.3
	Cynomolgus	4.3E+05	3.8E-04	8.6E-10	
IgG1-MPDL3280A-FEAR	Humana	7.2E+05	3.3E-04	4.6E-10	19.7
	Cynomolgus	3.6E+05	3.0E-03	9.0E-09	

Ejemplo 9: ensayo de bloqueo cruzado en sándwich clásico de PD-L1

La prueba de bloqueo cruzado de anticuerpos se realizó usando interferometría de biocapa (BLI) en un instrumento Octet HTX (ForteBio). Los anticuerpos (20 µg/mL en tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 6.0 (ForteBio)) se inmovilizaron en biosensores reactivos con aminas de segunda generación (AR2G) (ForteBio) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de una línea de base (50 s) en diluyente de muestras (ForteBio), los biosensores que contenían anticuerpos inmovilizados se cargaron durante 500 s con PDLoneECDHisCtag (100 nM o 2.7 µg/mL), después de lo cual se midió la respuesta de asociación de un segundo anticuerpo (10 µg/mL) seguido durante 500 s. Los biosensores se regeneraron utilizando 3 veces exposiciones alternas de 5 s a glicina 10 mM pH 2.5 y diluyente de muestra. El experimento se repitió con un nuevo conjunto de segundos anticuerpos a partir de la etapa inicial. Cada biosensor se utilizó 6 veces. El experimento se realizó a 30 °C usando una velocidad de agitador de 1000 rpm. Los datos se analizaron utilizando el software Data Analysis v9.0.0.12 (ForteBio). El eje Y se alineó con la etapa de asociación y se aplicó el filtrado de Savitzky-Golay. La respuesta promedio del tampón se restó de la respuesta de asociación del segundo anticuerpo para corregir la disociación de PDLoneECDHisCtag del anticuerpo inmovilizado. Las respuestas de asociación corregidas se representaron en un formato matricial. Las respuestas ≥ 0.1 nm se consideraron pares de anticuerpos no bloqueantes (los resultados se indican como números simples en la tabla de la Figura 6), las respuestas por debajo de 0.1 se consideraron pares de anticuerpos bloqueantes (los resultados se indican como números en negrita en la tabla de la Figura 6). Algunos pares de anticuerpos mostraron un comportamiento de desplazamiento (indicado por un asterisco (*) en la tabla de la Figura 6). En la figura (A) se muestran gráficos representativos para pares de anticuerpos de desplazamiento, (B), bloqueantes y (C) no bloqueantes.

Se realizaron experimentos de bloqueo cruzado para anticuerpos IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR, IgG1-511-LC33S-FEAR, IgG1-321-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR, IgG1-516-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR e IgG1-MEDI4736-FEAR. Los resultados se resumen en la figura 6.

Los datos muestran que el anticuerpo IgG1-511-LC33S-FEAR define un grupo de bloqueo cruzado único, porque bloquea IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1- 632-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR e IgG1-MEDI4736-FEAR, pero no bloquea la unión de IgG1-547-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR o IgG1-516-FEAR al PDL1 humano.

Además, el anticuerpo IgG1-547-FEAR define un grupo de bloqueo cruzado único, porque bloquea IgG1-321-FEAR,

IgG1-338-FEAR, IgG1-421-LC91S-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR e IgG1-MEDI4736-FEAR, pero no bloquea la unión de IgG1-511-LC33S-FEAR, IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR, IgG1-516-FEAR a PD1 humano.

Además, el anticuerpo IgG1-476-N101Q-LC33S-FEAR mostró un comportamiento de desplazamiento en combinación con IgG1-321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-MPDL3280A-FEAR e IgG1-MEDI4736-FEAR, lo que indica que los anticuerpos IgG1- 321-FEAR, IgG1-338-FEAR, IgG1-MEDI4736-FEAR e IgG1-MPDL3280A-FEAR se unen de manera diferente al PD-L1 humano en comparación con IgG1-421-LC19S-FEAR, IgG1-547-FEAR, IgG1-LC33S-FEAR, IgG1-632-FEAR e IgG1-516-FEAR.

Ejemplo 10: Efecto de los anticuerpos PD-L1 sobre la interacción PD-1/PD-L1

El efecto de los anticuerpos PD-L1 bivalentes y monovalentes sobre la interacción de PD-1 y PD-L1 se determinó en un bioensayo de bloqueo de PD-1/PD-L1 desarrollado por Promega (Madison, EE.UU.). Este es un ensayo basado en células bioluminiscentes que consiste en dos líneas celulares genéticamente modificadas: células efectoras PD-1, que son células T Jurkat que expresan PD-1 humano y un indicador de luciferasa impulsado por un elemento de respuesta NFAT (NFAT-RE), y células PD-L1 aAPC/CHO-K1, que son células CHO-K1 que expresan PD-L1 humano y una proteína de superficie celular diseñada para activar TCR afines de una manera independiente del antígeno. Cuando los dos tipos de células se cultivan conjuntamente, la interacción PD-1/PD-L1 inhibe la señalización de TCR y la luminiscencia mediada por NFAT-RE. La adición de un anticuerpo que bloquea la interacción PD-1/PD-L1 libera la señal inhibidora y da como resultado la activación del TCR y la luminiscencia mediada por NFAT-RE.

Se descongelaron células PD-L1 aAPC/CHO-K1 (Promega, cat. no. J109A) de acuerdo con el protocolo del fabricante, se resuspendieron en medio F12 de Ham (Promega, cat. no. J123A) que contenía suero bovino fetal al 10 % (FBS; Promega, cat. no. J121A), y se sembraron en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (CulturPlate-96, Perkin Elmer, cat. no. 6005680). Las placas se incubaron durante 16 horas a 37 °C, 5 % de CO_2. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron diluciones en serie de anticuerpos (concentración final que oscilaba entre 5 y 0.001 µg/mL; diluciones de 4 veces en RPMI 1640 [Lonza, cat. no. BE12-115F] que contenía suero bovino fetal al 1 % [FBS; Promega, cat. no. J121A]). Se añadieron células efectoras PD-1 (Promega, cat. no. J115A; descongeladas de acuerdo con el protocolo del fabricante y resuspendidas en RPMI/FBS al 1 %). Las placas se incubaron durante 6 h a 37 °C, 5 % de CO_2. Después del equilibrio a temperatura ambiente, se añadió a cada pocillo 40 µL de reactivo Bio-Glo (sustrato de ensayo de luciferasa Bio-Glo [Promega cat. no. G720B] reconstituido en tampón de ensayo de luciferasa Bio-Glo [Promega, cat. no. G7198] de acuerdo con el protocolo del fabricante). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos y se midió la luminiscencia utilizando un lector EnVision Multilabel (PerkinElmer). El efecto sobre la interacción PD1-PD-L1, en relación con el control (sin anticuerpo añadido), se calculó de la siguiente manera:
veces la inducción = RLU (fondo inducido)/RLU (sin fondo de control de anticuerpos), RLU es unidades de luz relativas.

La Figura 7 muestra que los anticuerpos monoespecíficos bivalentes IgG1-338-FEAR, IgG1-547-FEAR e IgG1-511-LC33S-FEAR bloquearon eficientemente la interacción entre PD1 y PD-L1 de una manera dependiente de la dosis. Los anticuerpos monovalentes bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR y bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR también bloquearon eficazmente la interacción PD1-PD-L1. bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR también bloqueó esta interacción, aunque de manera menos eficiente.

Ejemplo 11: Citotoxicidad *in vitro* de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1

Se probaron anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* usando líneas celulares tumorales como células diana y células T purificadas o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como células efectoras. Se aislaron células T de capas leucocitarias de donantes (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) utilizando el cóctel de enriquecimiento de células T humanas RosetteSep (Cat: 15021C.1, Stemcell Technologies, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se aislaron PBMC a partir de 40 mL de capa leucocitaria (Sanquin) utilizando un gradiente de Ficoll (Lonza; medio de separación de linfocitos, cat. no. 17-829E) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se sembraron células MDA-MB-231 (16,000 células/pocillo), células PC-3 (16,000 células/pocillo) o células HELA (10,000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (cat: 655180, Greiner- bio-one, Países Bajos) y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Se agregaron células T a las células tumorales en una proporción E:T = 4:1 para células MDA-MB-231 o PC-3, y E:T = 8:1 para células HELA. Se añadieron PBMC a las células tumorales en una proporción E:T = 10:1. Se agregaron diluciones seriadas de anticuerpos (la concentración final oscilaba entre 1000 y 0.06 ng/mL; diluciones 4 veces) y las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C. A continuación, se descartaron los sobrenadantes y las células adheridas se lavaron dos veces con PBS. Se añadieron 150 µL de solución de azul alamar al 10 % (cat: DAL1100, Life Technologies, Países Bajos), preparada en medio RPMI-1640 (cat: BE12-115F, Lonza, Suiza) que contenía un 10 % de suero bovino donante con hierro (cat: 10371- 029, Life Technologies, Países Bajos), a los pocillos y se incubó durante 5 h a 37 °C. La absorbancia se midió con un lector de placas multietiquetas Envision (PerkinElmer, EE. UU.). Las células tratadas con estaurosporina (cat: S6942, Sigma-Aldrich, EE. UU.) se establecieron con una viabilidad del 0 % y las células no tratadas se establecieron con una viabilidad del 100 %. El 'porcentaje de células viables' se calculó de la siguiente manera:

% de células viables = (absorbancia de la muestra - absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina)/(absorbancia de células diana no tratadas - absorbancia de células diana tratadas con estaurosporina) × 100.

Citotoxicidad de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 en células MDA-MB-231

La Figura 8 muestra que bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR y bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR indujeron citotoxicidad dependiente de la concentración en células MDA-MB-231, que expresan niveles relativamente altos de PD-L1, tanto cuando se utilizan células T purificadas (A) como PBMC (B) como células efectoras.

Citotoxicidad de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 en células PC-3

La Figura 9 muestra que bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR, bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR y bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR indujeron citotoxicidad dependiente de la concentración en células PC-3, tanto cuando se utilizan células T purificadas (A) como PBMC (B) como células efectoras. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR fue menos eficaz para inducir citotoxicidad en células PC-3, expresando niveles moderados de PD-L1.

Citotoxicidad de anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 en células HELA

La Figura 10 muestra que bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR fue capaz de inducir citotoxicidad en células HELA, que expresan niveles bajos de PD-L1, cuando se usan células T como células efectoras, y para un donante también cuando se usan PBMC. bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR fue menos capaz de inducir citotoxicidad en células HELA, y bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR no indujo citotoxicidad en células HELA.

Ejemplo 12: Activación y proliferación de células T mediante anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1

Se probaron anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 en un ensayo *in vitro* para medir la activación y proliferación de células T, usando células MDA-MB-231 como células diana y células T purificadas como células efectoras. Como control negativo se utilizó IgG1-b12 (con una región Fc capaz de interactuar con los receptores Fcy y C1q). Se aislaron PBMC a partir de 40 mL de capa leucocitaria (Sanquin) utilizando un gradiente de Ficoll (Lonza; medio de separación de linfocitos, cat. no. 17-829E) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir de las PBMC purificadas, se aislaron células T utilizando el cóctel de enriquecimiento de células T humanas RosetteSep (Stemcell Technologies, Francia; cat. no. 15021C.1) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células MDA-MB-231 se etiquetaron con CellTrace CFSE 0.07 µM (ThermoFisher Scientific, cat. no. C34554) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se sembraron (5,000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner-bio-one, Países Bajos, cat. no. 655180) y se adhirieron a los pocillos durante 4 horas a 37 °C. Se agregaron células T a las células tumorales en una proporción E:T = 8:1, es decir, 40,000 células/pocillo. Se añadieron diluciones seriadas de anticuerpos (la concentración final oscilaba entre 10,000 y 1.5 ng/mL; diluciones triples) y las placas se incubaron durante 4 días a 37 °C.

A continuación, los sobrenadantes (que contenían células no adherentes) se transfirieron a una placa con fondo en U de 96 pocillos (Greiner-bio-one), las células restantes se recogieron mediante tratamiento con tripsina-EDTA (Lonza) y se combinaron con el sobrenadante celular en la placa con fondo en U de 96 pocillos. Las células se lavaron con PBS (B. Braun) y se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C con un cóctel de anticuerpos: anti-huCD4-azul pacífico 1:200 (BioLegend, cat. no. 300521), anti-huCD8-FITC 1:50 (BD, cat. no. 345772), anti-huCD25-PE-Cy7 1:100 (eBiosciences, cat. no. 25-0259-42) y anti-huCD69-PE (BD, cat. no. 555531). Las células se lavaron una vez con tampón FACS enfriado con hielo y se resuspendieron en 80 µL de tampón FACS suplementado con topro-3-yodo diluido 1:6000 (ThermoFisher Scientific, cat. no. T3605).
La proliferación de células T se determinó contando el número total de células T $CD4^{pos}$ y $CD8^{pos}$ en un volumen fijo de 50 µL en un citómetro de flujo. La activación de las células T se midió contando el número de células $CD69^{pos}$ (etiqueta de activación temprana de las células T) y $CD25^{pos}$ (activación tardía de las células T) en un volumen fijo de 50 µL en un citómetro de flujo. La Figura 11 muestra que todos los anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1 indujeron la proliferación de células T (indicada por el aumento en el número total de células T). Sin embargo, se observaron diferencias en la cantidad de células T activadas y totales entre los diferentes anticuerpos biespecíficos CD3xPD-L1, siendo bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR menos eficaz y bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR más eficaz.

Ejemplo 13. Determinación de la contribución de los residuos de aminoácidos de PD-L1 en la unión de anticuerpos mediante escaneo de alanina.

Diseño de biblioteca

Se sintetizó una biblioteca de alanina de residuo único de PD-L1 (Uniprot Q9NZQ7) (Geneart) en la que todos los residuos de aminoácidos en el dominio extracelular de PD-L1 humano se mutaron individualmente a alaninas excepto las posiciones que ya contenían alaninas o cisteínas. Las cisteínas no fueron mutadas para minimizar la posibilidad

de alteración estructural del antígeno. La biblioteca se clonó en el vector de expresión pMAC que contenía un casete de expresión CMV/TK-poliA, un gen de resistencia a Amp y un origen de replicación pBR322.

Producción y detección de biblioteca

Los mutantes de alanina y PD-L1 de tipo silvestre se expresaron individualmente en células HEK293 FreeStyle de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific). Un día después de la transfección se recogieron las células. Se incubaron aproximadamente 100,000 células con 20 µL de anticuerpo de interés conjugado con Alexa488 en tampón FACS (Tabla 3). Las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 150 µL de tampón FACS y las células se lavaron mediante centrifugación. Las células se suspendieron en 20 µL de tampón FACS fresco (PBS [sin Ca^{++}, Mg^{++} y rojo fenol]/fracción V de BSA al 1 %/NaN_3 al 0.02 %) y se almacenaron a 4 °C hasta el análisis por citometría de flujo usando un analizador iQue.

Todo el experimento se realizó 4 veces.

Anticuerpo	concentración patrón	Conjugado
BsG1-b12-FEALx547-FEAR-A488	3 µg/mL	Alexa488
BsG1-b12-FEALx338-FEAR-A488		
IgG1-511-FEAR-LC33S-A488		
BsG1-b12-FEALx MPDL3280A-FEAR-A488		
IgG1-MEDI4736-FEAR		
IgG1-625-FEAR-A488 (usado como control)		

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en la determinación de la contribución de los residuos de aminoácidos de PD-L1 en la unión de anticuerpos mediante exploración con alanina.

Análisis de los datos

Para cada muestra, la unión de anticuerpo promedio por célula se determinó como la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (gMFI) para la población de células no controladas. El gMFI está influenciado por la afinidad del anticuerpo por el mutante de PD-L1 y el nivel de expresión del mutante de PD-L1 por célula. Dado que las mutaciones de alanina específicas pueden afectar el nivel de expresión superficial del PD-L1 mutante, y para corregir las diferencias de expresión para cada mutante de PD-L1 en general, los datos se normalizaron frente a la intensidad de unión de un anticuerpo de control específico de PD-L1 sin bloqueo cruzado (IgG1-625-FEAR-A488; que comprende la región variable de cadena pesada (VH) establecida en la SEQ ID NO: 106 y la región variable de cadena ligera (VL) establecida en la SEQ ID NO: 110), usando la siguiente ecuación:

$$gMFI_{\text{posición de aa normalizado}} = \frac{gMFI_{\text{Ab de prueba}}}{gMFI_{\text{Ab de control}}}$$

En la que 'posición de aa' se refiere a un mutante ala particular de PD-L1 o PD-L1 de tipo silvestre (wt).

Para expresar la pérdida o ganancia de unión de los anticuerpos en una escala lineal de veces que cambia, se usó el siguiente cálculo:

$$\text{Veces que cambia} = Log_{10}\left(\frac{gMFI_{\text{mutante ala normalizado}}}{gMFI_{\text{silvestre normalizado}}}\right)$$

La ganancia de unión en la mayoría de los casos será causada por la pérdida de unión del anticuerpo de referencia a mutantes ala específicos.

Tras estos cálculos, las posiciones de aminoácidos para las cuales, al reemplazar el aminoácido con alanina, no hay pérdida o ganancia de unión por parte de un anticuerpo particular darán como resultado '0', la ganancia de unión dará como resultado '>0' y la pérdida de unión dará como resultado '<0'. Para corregir la variación de la muestra, solo se utilizaron residuos de aminoácidos de PD-L1 en los que las veces que cambia en la unión fue menor que la media de las veces que cambia: 1.5 × DE (indicado por la línea de puntos en la Figura 12), en la que DE es la desviación de las veces que cambia calculada de cuatro experimentos independientes para un anticuerpo de prueba particular se consideraron 'pérdida de mutantes de unión'.

En caso de que el gMFI del anticuerpo de control para un mutante PD-L1 particular fuera menor que el gMFI medio – 2.5 × DE del $gMFI_{\text{Ab de control}}$ medio, los datos se excluyeron del análisis (en cuanto a esos mutantes PD-L1 se supuso que los niveles de expresión no fueron suficientes).

La Figura 12 muestra las veces que cambia en la unión de los anticuerpos PD-L1 a variantes de PD-L1 con mutaciones ala en las posiciones 42 a 131 (de acuerdo con la SEQ ID No 94). Los resultados indican que

- la unión del anticuerpo 338 depende al menos de los aa de R113, Y123 y R125 de PD-L1 humano,
- la unión del anticuerpo 511 depende al menos de los aa de F19, F42, E45, K46, L94 e I116 de PD-L1 humano; los aminoácidos de E45, K46 y L94 están directamente implicados en la unión del anticuerpo y F19, F42 e I116 están implicados indirectamente en la unión del anticuerpo debido a sus cadenas laterales enterradas,
- la unión del anticuerpo 547 depende al menos de los aa de E58 y R113 del PD-L1 humano,
- la unión del anticuerpo MEDI4736 depende al menos de los aa de R113 y R125 del PD-L1 humano,
- y la unión del anticuerpo MPDL3280A depende al menos de los aa de R125 e I126 de PD-L1 humano, donde I126, debido a su cadena lateral enterrada, puede estar implicado indirectamente en la unión del anticuerpo.

Ejemplo 14: Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC)

ADCC determinada en un ensayo de liberación de ^{51}Cr

Se recogieron células MDA-MB-231 (ATCC, cat. no. HTB-26) (para obtener 7 x 10^6 células), se lavaron (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min) y se recogieron en 2 mL de medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternera Cosmic (CCS) al 10 % (HyClone, Logan, UT, EE. UU.)), al que se añadieron ^{51}Cr 200 µCi (cromo-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, Países Bajos). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C mientras se agitaba. Después del lavado (dos veces en PBS, 1500 rpm, 5 min), las células se resuspendieron en medio RPMI 1640/CCS al 10 % y se contaron mediante exclusión con azul tripán. Las células se ajustaron a una concentración de 1 x 10^5 células/mL.

Mientras tanto, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de capa leucocitaria nueva (Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos) usando centrifugación de densidad Ficoll estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante (medio de separación de linfocitos; Lonza, Verviers, Francia). Después de la resuspensión de las células en medio RPMI 1640/CCS al 10 %, las células se contaron mediante exclusión con azul tripano y se ajustaron a 1 x 10^7 células/mL.

Se transfirieron 50 µL de células diana etiquetadas con ^{51}Cr a pocillos de microtitulación y se añadieron 50 µL de anticuerpo PD-L1 de 30 µg/mL (diluido en RPMI/CCS al 10 %). Como control positivo, se usó un anticuerpo contra una diana no relacionada expresada en células MDA-MB-231. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 50 µL de células efectoras (PBMC), lo que dio como resultado una proporción efector a diana de 100:1. Para determinar la cantidad máxima de lisis celular, se agregaron 100 µL de Triton-X100 al 5 % en lugar de células efectoras. Se agregaron 100 µL de RPMI 1640/CCS al 10 % en lugar de células efectoras y anticuerpo para determinar la cantidad de lisis espontánea. Además, para determinar el nivel de lisis celular independiente de anticuerpos, se añadieron 50 µL de células efectoras y 50 µL de medio (en lugar de anticuerpo). Las muestras se incubaron durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO_2. Para determinar la cantidad de lisis de células diana, las muestras se centrifugaron (1200 rpm, 3 min) y se transfirieron 75 µL de sobrenadante a tubos Micronic, después de lo cual se contó el ^{51}Cr liberado usando un contador gamma. El porcentaje de lisis mediada por anticuerpos se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{\text{(recuentos por minuto [cpm] de la muestra - cpm de la lisis independiente de anticuerpos)}}{\text{(cpm de lisis máxima − cpm de lisis espontánea)}} \times 100\ \%$$

La Figura 13 muestra que IgG1-547-F405L indujo ~10 % de lisis dependiente de la dosis de células MDA-MB-231 a través de ADCC. El anticuerpo de control positivo indujo sólo un 20 % de lisis máxima, lo que indica que la lisis total en este experimento fue bastante baja. IgG1-511-F405L-LC33S e IgG1-338-F405L no indujeron la lisis de MDA-MB-231.

ADCC determinada en un bioensayo luminiscente informador de ADCC

La capacidad de los anticuerpos PD-L1 para inducir el entrecruzamiento de FcγRIIIa (CD16), como sustituto de ADCC, también se determinó usando un bioensayo luminiscente informador de ADCC (Promega, Cat # G7018) en células MDA-MB-231, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Como células efectoras, el kit contiene células T humanas Jurkat diseñadas para expresar de manera estable FcγRIIIa (V158) de alta afinidad y un elemento de respuesta al factor nuclear de células T activadas (NFAT) que impulsa la expresión de la luciferasa de luciérnaga. Brevemente, se sembraron células MDA-MB-231 (12,500 células/pocillo) en Culture OptiPlates (Perkin Elmer) en tampón de ensayo ADCC [medio RPMI-1640 [(Lonza, Cat # BE12-115F) suplementado con suero bajo en IgG al 3.5 %] y se incubaron durante 6 horas a 37 °C/5 % de CO_2 en un volumen total de 75 µL que contenía series de concentraciones de anticuerpos (concentraciones finales de 0.5 a 250 ng/mL en diluciones de 3.5 veces) y células efectoras de bioensayo ADCC descongeladas. Después de ajustar las placas durante 15 minutos a temperatura ambiente (RT), se añadieron 75 µL de reactivo de luciferasa de ensayo Bio Glo y las placas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La producción de luciferasa se cuantificó mediante lectura de luminiscencia en un lector EnVision Multilabel (Perkin Elmer). Los niveles de fondo se determinaron a partir de pocillos a los que sólo se añadieron células diana y anticuerpos (sin células efectoras). Como control negativo, se utilizaron pocillos que contenían únicamente células diana y efectoras (sin anticuerpo).

La Figura 14 muestra que IgG1-547-F405L fue altamente eficaz en la inducción de ADCC como se determinó en el

ensayo indicador. También IgG1-MEDI4736-F405L e IgG1-MPDL3280A-K409R indujeron ADCC, pero no en la misma medida que IgG1-547-F405L. IgG1-511-F405L-LC33S e IgG1-338-F405L no indujeron ADCC.

Listado de secuencias

SEQ ID NO	Etiqueta	Secuencia
1	VH-338	EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRFWMSWVRQAPGKGL EWVANIKQDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDT AVYYCARDDNWNGHFDYWGQGTLVTVSS
2	VH-338-CDR1	GFTFSRFW
3	VH-338-CDR2	IKQDGGEK
4	VH-338-CDR3	ARDDNWNGHFDY
5	VK-338	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPNLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYYGSYI TFGQGTRLEIK
6	VK-338-CDR1	QSISSW
	VK-338-CDR2	KAS
7	VK-338-CDR3	QQYYGSYIT
8	VH-511	QVQLVQSGSELKKPGASVMVSCKASGYTFTSYVMNWVRQAPGQGL EWMGWINSYTGNPTSAQGFTGRFVFSFDTSVNTAYLQISSLKAEDTA VYYCARGYCTSTSCYLDYWGQGTLVTVSS
9	VH-511-CDR1	GYTFTSYV
10	VH-511-CDR2	INSYTGNP
11	VH-511-CDR3	ARGYCTSTSCYLDY
12	VL-511	SYELTQPPSVSVSPGHTARITCSGDALPKKYACWFQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPERFSGSTSGTMATLTISGAQVEDETDYYCYSADTSG THRVFGGGTKLTVL
13	VL-511-CDR1	ALPKKY
	VL-511-CDR2	EDS
14	VL-511-CDR3	YSADTSGTHRV
15	VL-511-LC33S	SYELTQPPSVSVSPGHTARITCSGDALPKKYA**S**WFQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPERFSGSTSGTMATLTISGAQVEDETDYYCYSADTSG THRVFGGGTKLTVL
16	VL-511-LC33S-CDR1	ALPKKY
	VL-511-LC33S-CDR2	EDS
17	VL-511-LC33S-CDR3	YSADTSGTHRV

SEQ ID NO	Etiqueta	Secuencia
18	VH-547	EVQLLEPGGGLVQPGGSLRLSCEASGSTFSTYAMSWVRQAPGKGLE WVSGFSGSGGFTFYADSVRGRFTISRDSSKNTLFLQMSSLRAEDTAV YYCAIPARGYNYGSFQHWGQGTLVTVSS
19	VH-547-CDR1	GSTFSTYA
20	VH-547-CDR2	FSGSGGFT
21	VH-547-CDR3	AIPARGYNYGSFQH
22	VL-547	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDNDRPSGLPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFGGGTKLTVL
23	VL-547-CDR1	NIGSKS
	VL-547-CDR2	DDN
24	VL-547-CDR3	QVWDSSSDHVV
25	VH-huCD3-H1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
26	VH-huCD3-H1-CDR1	GFTFNTYA
27	VH-huCD3-H1-CDR2	IRSKYNNYAT
28	VH-huCD3-H1-CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
29	VL-huCD3-L1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAF RGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWY SNLWVFGGGTKLTVL
30	VL-huCD3-L1-CDR1	TGAVTTSNY
	VL-huCD3-L1-CDR2	GTN
31	VL-huCD3-L1-CDR3	ALWYSNLWV
32	VH-321	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLE WVANIKQDGNEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYVQMNSLRAEDTA VYYCARDLYYGSGTYPPFDYWGQGTLVTVSS
33	VH-321-CDR1	GFTFSSYW
34	VH-321-CDR2	IKQDGNEK
35	VH-321-CDR3	ARDLYYGSGTYPPFDY
36	VK-321	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYLQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYHSSS YTFGQGTKLEIK
37	VK-321-CDR1	QSISSW

SEQ ID NO	Etiqueta	Secuencia
	VK-321-CDR2	KAS
38	VK-321-CDR3	QQYHSSSYT
39	VH-huCD3-H1-T31P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNPYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
40	VH-huCD3-H1-T31M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
41	VH-huCD3-H1-Y114V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYVWGQGTLVTVSS
42	VH-huCD3-H1-Y114M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAMWGQGTLVTVSS
43	VH-huCD3-H1-Y116R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFARWGQGTLVTVSS
44	VH-huCD3-H1-S110A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVAWFAYWGQGTLVTVSS
45	VH-huCD3-H1-H101G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRGGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
46	VH-421	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQGPGKGLE WVSGIRWNSGSMHYADSVKGRFTISRDNAKSSLYLQMNSLRAEDTA LYYCARAPWYSGAWHPDYWGQGTLVTVSS
47	VH-421-CDR1	GFTFDDYA
48	VH-421-CDR2	IRWNSGSM
49	VH-421-CDR3	ARAPWYSGAWHPDY
50	VL-421-C91S	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSDVGTYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVIKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTLSGLQAEDEADYYC**S**SY AGTYTLLFGGGTKLTVL
51	VL-421-C91S-CDR1	SSDVGTYNY
	VL-421-C91S-CDR2	DVI

SEQ ID NO	Etiqueta	Secuencia
52	VL-421-C91S-CDR3	**S**SYAGTYTLL
53	VH-476-N101Q	EVQMLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLE WVSGIGDSGGSTYHADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKLG**Q**SSGWYDHYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
54	VH-476-N101Q-CDR1	GFTFRSYA
55	VH-476-N101Q-CDR2	IGDSGGST
56	VH-476-N101Q-CDR3	AKLG**Q**SSGWYDHYYYYGMDV
57	VL-476-C33S	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYV**S**WFQQKPGQSPVLVI YRDSERPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADFYCQAWDSST VVFGGGTKLTVL
58	VL-476-C33S-CDR1	KLGNKY
	VL-476-C33S-CDR2	RDS
59	VL-476-C33S-CDR3	QAWDSSTVV
60	VH-516	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCAVSDYSISSNDWWGWIRQPPGKGL EWIGYIYYSGTGYYNPSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLNSVTAVDTAVY YCARTRVGARRAFDYWGQGTLVTVSS
61	VH-516-CDR1	DYSISSNDW
62	VH-516-CDR2	IYYSGTG
63	VH-516-CDR3	ARTRVGARRAFDY
64	VL-516	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLV VYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFGGGTKLTVL
65	VL-516-CDR1	NIGSKS
	VL-516-CDR2	DDS
66	VL-516-CDR3	QVWDSSSDHVV
67	VH-632	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYIGSSSNTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YSCARDRVKYGSPGSLFDYWGQGTLVTVSS
68	VH-632-CDR1	GFTFSDYY
69	VH-632-CDR2	IGSSSNTI
703	VH-632-CDR3	ARDRVKYGSPGSLFDY
71	VL-632	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAFWYQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPERFSGSSSGTMATLTISGAQVEDEADYYCYSTASSG DHRVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO	Etiqueta	Secuencia
72	VL-632-CDR1	ALPKKY
	VL-632-CDR2	EDS
73	VL-632-CDR3	YSTASSGDHRV
74	VH-MPDL3280A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWYRQAPGKGLE WYAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS
75	VH-MPDL3280A-CDR1	GFTFSDSW
76	VH-MPDL3280A-CDR2	ISPYGGST
77	VH-MPDL3280A-CDR3	ARRHWPGGFDY
78	VL-MPDL3280A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHP ATFGQGTKVEIK
79	VL-MPDL3280A-CDR1	QDVSTA
	VL-MPDL3280A-CDR2	SAS
80	VL-MPDL3280A-CDR3	QQYLYHPAT
81	VH-MEDI4736B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLE WVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLVTVSS
82	VH-MEDI4736B-CDR1	GFTFSRYW
83	VH-MEDI4736B-CDR2	IKQDGSEK
84	VH-MEDI4736B-CDR3	AREGGWFGELAFDY
85	VL-MEDI4736B	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSL PWTFGQGTKVEIK
86	VL-MEDI4736B-CDR1	QRVSSSY
	VL-MEDI4736B-CDR2	DAS
88	VL-MEDI4736B-CDR3	QQYGSLPWT

SEQ ID NO	Etiqueta	Secuencia
89	IgG1-FEAR-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
90	IgG1-FEAL-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
91	Kappa-C	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
92	Lambda-C	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS
93	IgG1m(f) - VH - aa 118-447 numeración EU	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO	Etiqueta	Secuencia
94	PD-L1 (GenBank acceso no. NP_054862.1)	MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQL DLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLG NAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILV VDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKL FNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTH LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLE ET
95	CD3ε humano maduro	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGG DEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLR ARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPV TRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI
96	Región CH3 de IgG1m(a)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
97	Región CH3 de IgG1m(f)	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
98	Región CH3 de IgG1m(ax)	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLH NHYTQKSLSLSPGK
99	VH-huCD3-H1-CDR1-T31P	GFTFNPYA
100	VH-huCD3-H1-CDR1-T31M	GFTFNMYA
101	VH-huCD3-H1-CDR3-Y114V	VRHGNFGNSYVSWFAV
102	VH-huCD3-H1-CDR3-Y114M	VRHGNFGNSYVSWFAM
103	VH-huCD3-H1-CDR3-Y116R	VRHGNFGNSYVSWFAR
104	VH-huCD3-H1-CDR3-S110A	VRHGNFGNSYVAWFAY
105	VH-huCD3-H1-CDR3-H101G	VRGGNFGNSYVSWFAY
106	VH-7717-625	HMQLVESGGGVAQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGRGL EWLAVMSYDGETKYYADSVKGRFTISRDNSENTLFLQMNSLRAEDTA VYYCAKDTSNGWNYYFYGMDVWGQGTTVTVSS
107	VH-7717-625_CDR1	GFTFSNYG
108	VH-7717-625_CDR2	MSYDGETK

SEQ ID NO	Etiqueta	Secuencia
109	VH-7717-625_CDR3	AKDTSNGWNYYFYGMDV
110	VL-7717-625	SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKFASWYQQKSGQAPVLVI YEDSKRPSGIPERVSGSSSGTMATLTISGAQTEDEADYYCYSTDRSG YHWVFGGGTKLTVL
111	VL-7717-625_CDR1	ALPKKF
	VL-7717-625_CDR2	EDS
112	VL-7717-625_CDR3	YSTDRSGYHWV
113	IgG1m(f)_constante	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	IgG 1-K409R_domino constante	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
		REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYS**R**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	IgG 1-F405L_ domino constante	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSF**L**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, en el que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100% con la secuencia de VH expuesta en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100% con la secuencia de VL expuesta en: la SEQ ID NO: 22.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es monovalente.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo bivalente que tiene dos regiones de unión a antígeno capaces de unirse a PD-L1 humano y en el que dichas dos regiones de unión a antígeno tienen secuencias de regiones variables idénticas.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 3, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo biespecífico bivalente, que, además de dicha (primera) región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano, comprende una (segunda) región de unión a antígeno capaz de unirse a un segundo antígeno o a un epítopo diferente de PD-L1 humano, en el que dicho segundo antígeno es CD3ε no humano.

5. Un anticuerpo biespecífico que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano y una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε (épsilon) humano, en el que la región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VH expuesta en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VL expuesta en: la SEQ ID NO: 22.

6. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano comprende (a) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 28, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 31, respectivamente.

7. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en el que la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano comprende una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29.

8. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo biespecífico:

(i) tiene una menor afinidad por la unión a CD3ε humano en comparación con un anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno capaz de comprender una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 25 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, preferiblemente en el que dicha afinidad es al menos 2 veces menor, por ejemplo, al menos 5 veces menor, tal como al menos 10 veces menor, por ejemplo, al menos 25 veces menor, tal como al menos 50 veces menor, y
(ii) es capaz de mediar la citotoxicidad dependiente de la concentración de células MDA-MB-231, células PC-3 y/o células HELA cuando se utilizan PBMC o células T purificadas como células efectoras, por ejemplo, cuando se analiza como se describe en el Ejemplo 11 del presente documento.

9. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano comprende:

(i) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 99, 27 y 28, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o
(ii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 100, 27 y 28, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o
(iii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 101, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o
(iv) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 102, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o

(v) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 103, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o
(vi) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 104, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente, o
(vii) una región variable de cadena pesada (VH) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID NOs: 26, 27 y 105, respectivamente, y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen las secuencias establecidas en la SEQ ID NO: 30, la secuencia GTN y la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 31, respectivamente.

10. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que la región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano comprende:

(i) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO: 39 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(ii) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO:40 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(iii) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO:41 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(iv) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO:42 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(v) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO:43 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(vi) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO:44 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29, o
(vii) una secuencia de VH como se establece en la SEQ ID NO:45 y una secuencia de VL como se establece en la SEQ ID NO: 29.

11. Un anticuerpo multiespecífico que comprende una primera región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano y una segunda región de unión a antígeno capaz de unirse a un segundo antígeno o a un epítopo diferente de PD-L1 humano, en el que dicha región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano comprende una secuencia de VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VH expuesta en: la SEQ ID NO: 18 y una secuencia de VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 100 % con la secuencia de VL establecida en: la SEQ ID NO: 22.

12. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el anticuerpo es biespecífico.

13. El anticuerpo multiespecífico de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en el que el anticuerpo es capaz de unirse a un segundo antígeno y dicho segundo antígeno no es CD3ε humano.

14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-13, en el que el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

15. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

16. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

17. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende una primera y segunda cadena pesada, en el que cada una de dichas primera y segunda cadenas pesadas comprende al menos una región bisagra, una región CH2 y una región CH3, en el que en dicha primera cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en una posición correspondiente a una posición seleccionada del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 de acuerdo con la numeración EU ha sido sustituido, y en dicha segunda cadena pesada al menos uno de los aminoácidos en una posición correspondiente a una posición seleccionada del grupo que consiste en T366, L368, K370, D399, F405, Y407 y K409 de acuerdo con la numeración EU ha sido sustituido, y en el que dicha primera y dicha segunda cadenas pesadas no se sustituyen en las mismas posiciones.

18. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, en el que (i) el aminoácido en la posición correspondiente a F405 de acuerdo con la numeración EU es L en dicha primera cadena pesada, y el aminoácido en la posición correspondiente a K409 de acuerdo con la numeración EU es R en dicha segunda cadena pesada, o (ii) el aminoácido en la posición correspondiente a K409 de acuerdo con la numeración EU es R en dicha primera cadena pesada, y el

aminoácido en la posición correspondiente a F405 de acuerdo con la numeración EU es L en dicha segunda cadena pesada.

19. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo comprende una primera y una segunda cadenas pesadas y en el que una o ambas cadenas pesadas están modificadas de modo que el anticuerpo induce la función efectora mediada por Fc en menor medida con respecto a una anticuerpo que es idéntico, excepto que comprende una primera y una segunda cadenas pesadas no modificadas.

20. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicha función efectora mediada por Fc se mide determinando la expresión de CD69 mediada por Fc, uniéndose a receptores Fcγ, uniéndose a C1q o mediante la inducción de entrecruzamiento de FcR mediado por Fc.

21. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17 o 20, en el que las secuencias constantes de las cadenas pesada y ligera se han modificado de modo que dicho anticuerpo reduzca la expresión de CD69 mediada por Fc en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 99 % o 100 % en comparación con un anticuerpo de tipo silvestre en el que dicha expresión de CD69 mediada por Fc se determina en un ensayo funcional basado en PBMC.

22. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo comprende una primera y una segunda cadena pesada, en el que en al menos una de dichas primera y segunda cadenas pesadas uno o más aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235, D265, N297 y P331 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU no son L, L, D, N y P, respectivamente.

23. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22, en el que las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU son F y E, respectivamente, en dichas primera y segunda cadenas pesadas.

24. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 23, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera y una segunda cadena pesada y en el que las posiciones correspondientes a las posiciones L234 y L235 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU tanto de la primera cadena pesada como la segunda cadena pesada son F y E, respectivamente, y en el que (i) la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es L, y la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es R, o (ii) la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es R, y la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es L.

25. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 22, en el que las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU son F, E y A, respectivamente, en dichas primera y segunda cadenas pesadas.

26. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 25, en el que el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera y una segunda cadena pesada y en el que las posiciones correspondientes a las posiciones L234, L235 y D265 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU tanto de la primera cadena pesada como de la segunda cadena pesada son F, E y A, respectivamente, y en el que (i) la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es L, y la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es R, o (ii) la posición correspondiente a K409 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la primera cadena pesada es R, y la posición correspondiente a F405 en una cadena pesada de IgG1 humana de acuerdo con la numeración EU de la segunda cadena pesada es L.

27. Una construcción de ácido nucleico que comprende:

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano como se define en la reivindicación 1, y
(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano como se define en la reivindicación 1.

28. La construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 27, que comprende, además

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena pesada de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, y

(ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de cadena ligera de un anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a CD3ε humano como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.

29. Un vector de expresión que comprende una construcción de ácido nucleico como se define en la reivindicación 27 o 28.

30. Una célula huésped que comprende una construcción de ácido nucleico como se define en la reivindicación 27 o 28 o un vector de expresión como se define en la reivindicación 29.

31. La célula huésped de acuerdo con la reivindicación 30, en la que dicha célula huésped es una célula de mamífero, tal como una célula de ovario de hámster chino.

32. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

33. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 32 para uso como medicamento.

34. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 32 para uso en el tratamiento del cáncer.

35. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 32 para su uso en el tratamiento de una enfermedad cancerosa caracterizada por la presencia de tumores sólidos.

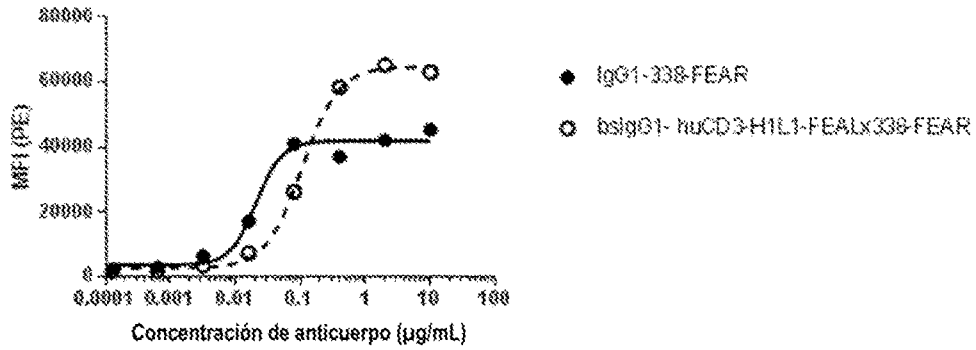
36. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 32 para uso en el tratamiento de una enfermedad cancerosa seleccionada del grupo que consiste en: melanoma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer de cabeza y cuello.

37. El anticuerpo o composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 33 a 36, en el que el uso comprende la combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente quimioterapéutico.

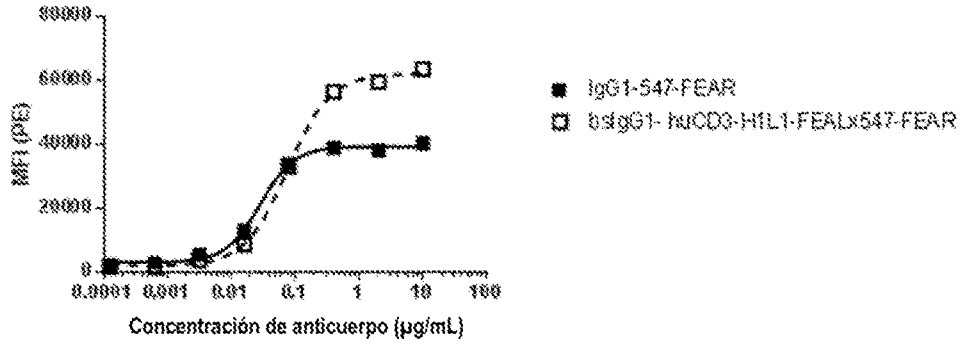
38. Un método para producir un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10 o 12 a 26, que comprende las etapas de:

a) cultivar una célula huésped que produce un primer anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a PD-L1 humano como se define en la reivindicación 1 y purificar dicho primer anticuerpo del cultivo;
b) cultivar una célula huésped que produce un segundo anticuerpo que comprende una región de unión a antígeno capaz de unirse a un epítopo diferente de PD-L1 o un antígeno diferente, por ejemplo, una región de unión a CD3ε humano como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, y purificar dicho segundo anticuerpo del cultivo;
c) incubar dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo en condiciones reductoras suficientes para permitir que las cisteínas en la región bisagra experimenten una isomerización por enlace disulfuro, y
d) obtener dicho anticuerpo biespecífico.

A


80000
60000
40000
20000
0
MFI (CD3)
0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR

B


80000
60000
40000
20000
0
MFI (CD3)
0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-547-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR

C

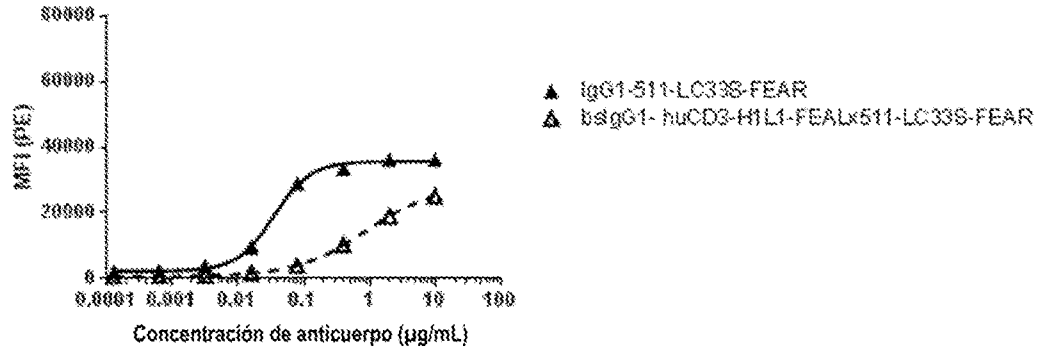
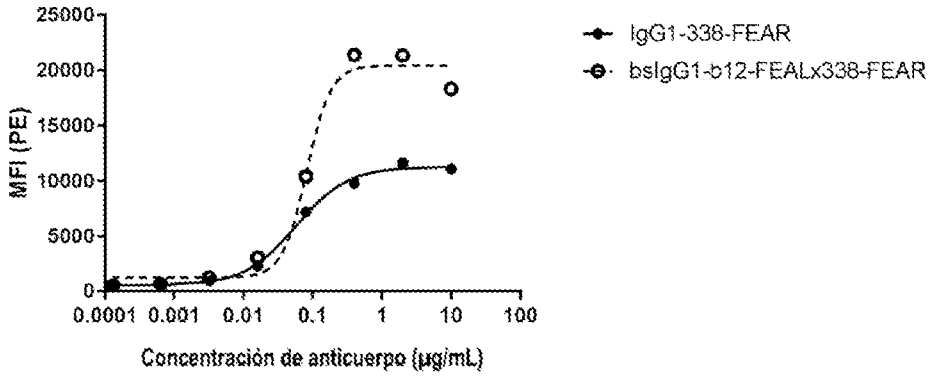
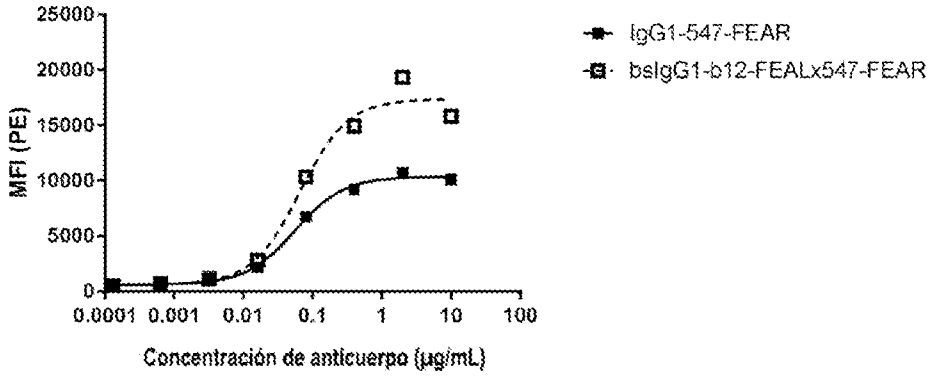

80000
60000
40000
20000
0
MFI (CD3)
0,0001 0,001 0,01 0,1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-511-LC33S-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR

Figura 1

D



E



F

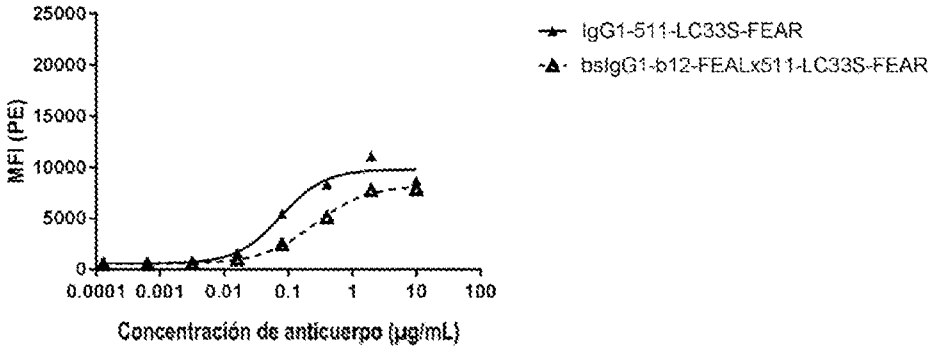
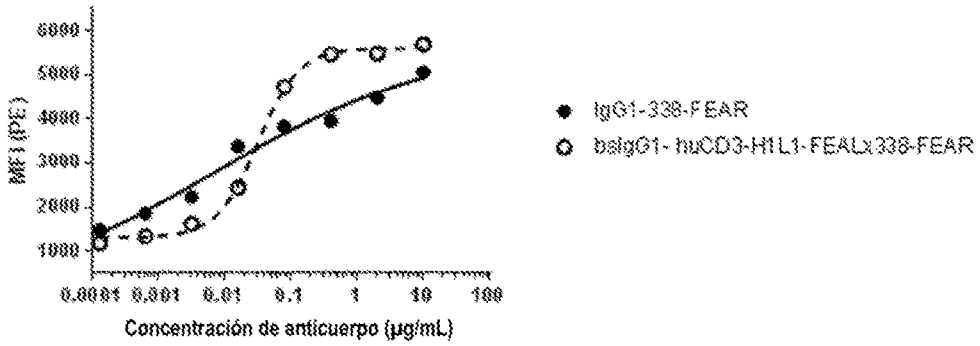
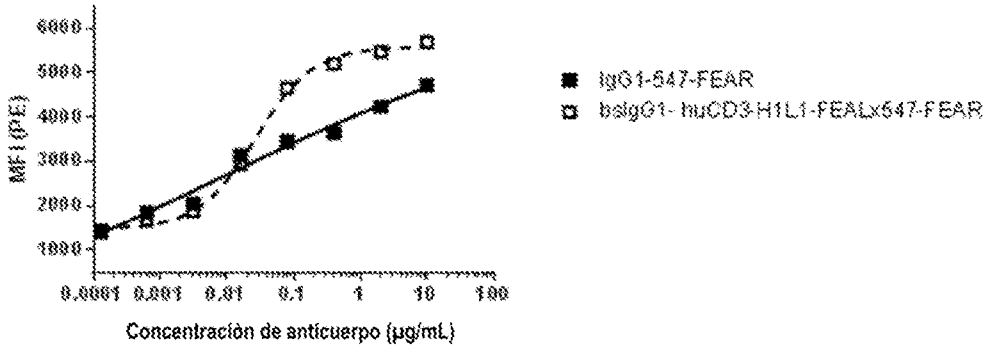


Figura 1, continuación

A


MFI (PE)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR

B


MFI (PE)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-547-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR

C

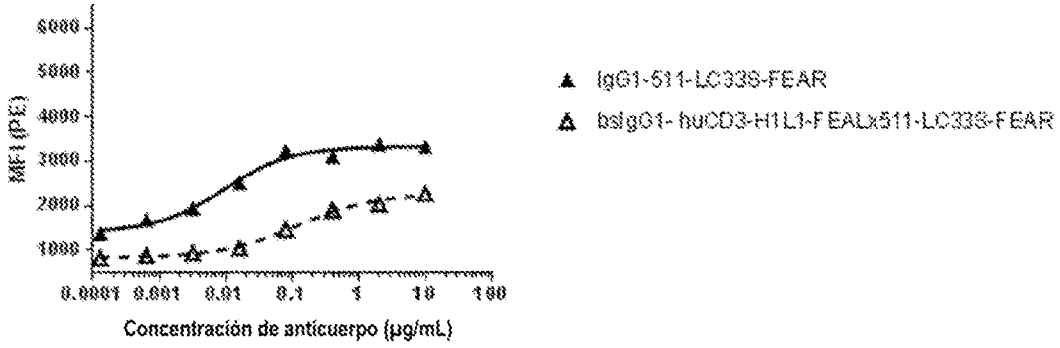
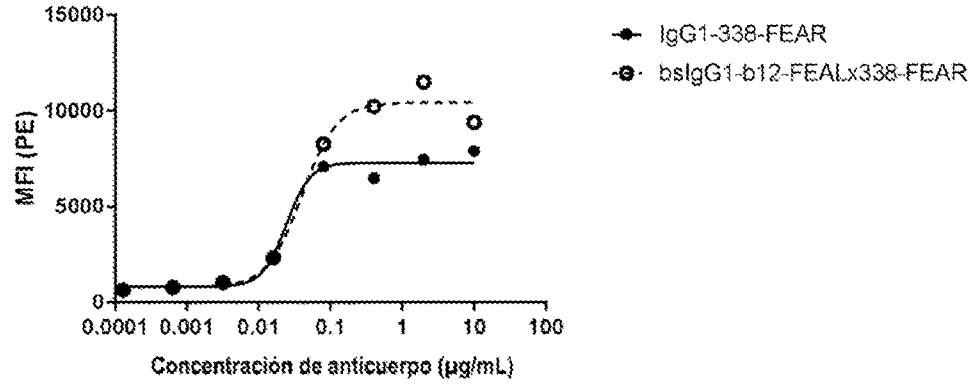
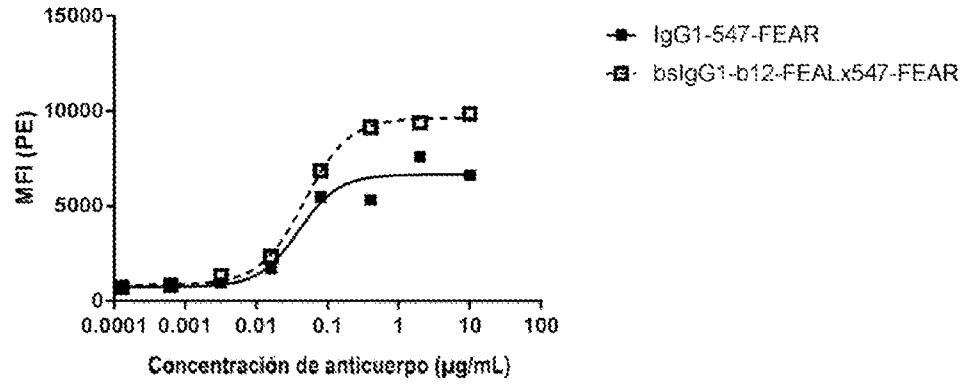

MFI (PE)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-511-LC338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx511-LC338-FEAR

Figura 2

D



E



F

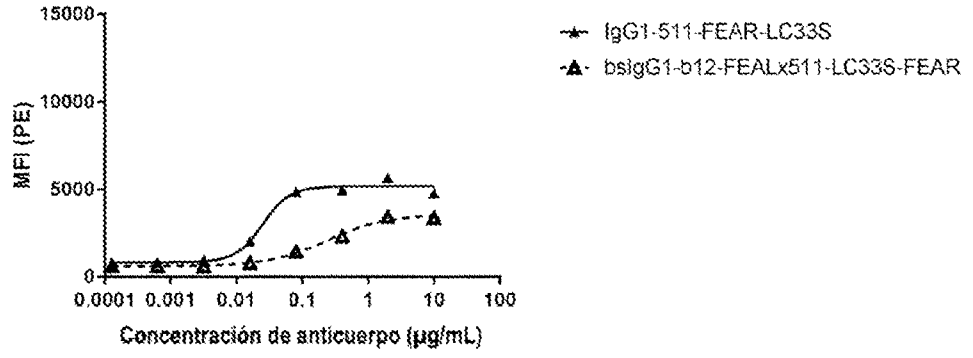
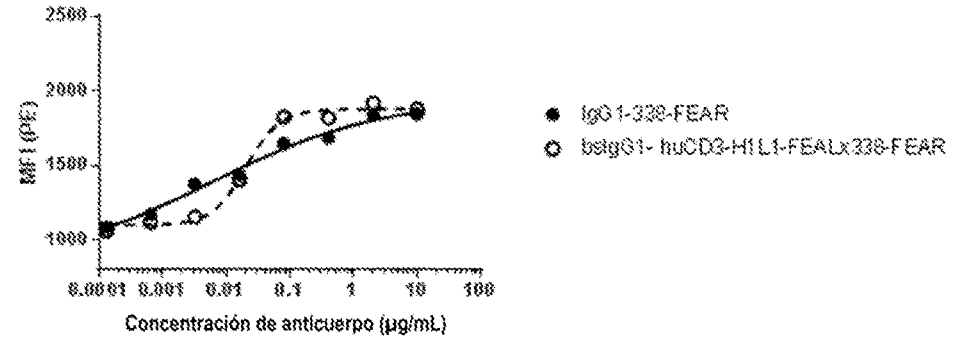
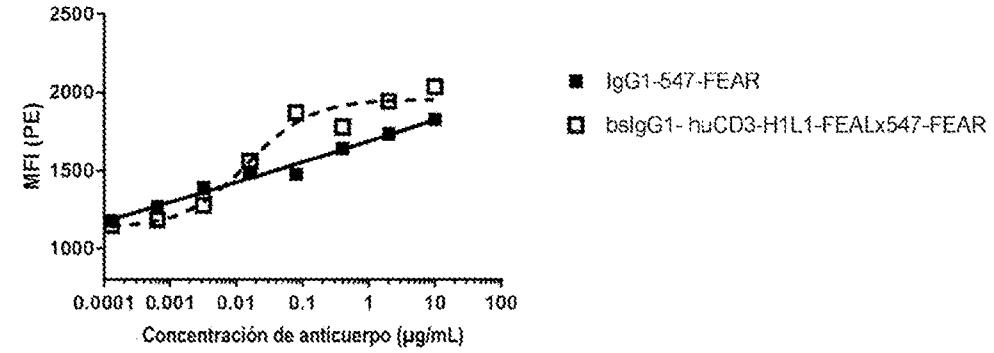


Figura 2, continuación

A


2500
2000
1500
1000
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR

B


2500
2000
1500
1000
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-547-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR

C

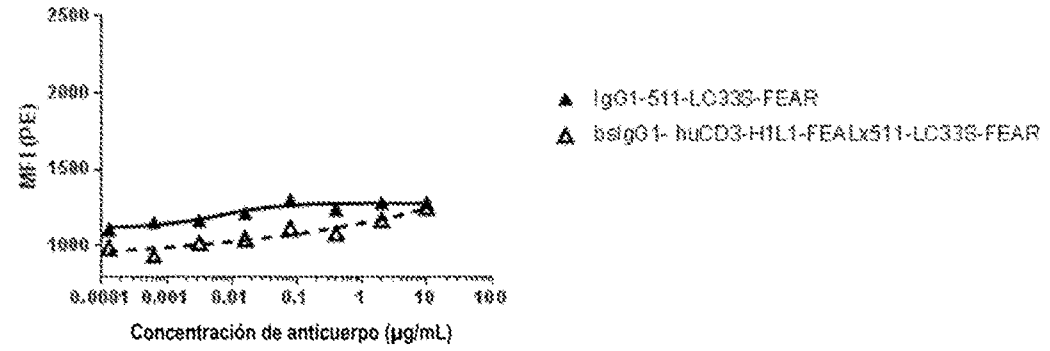
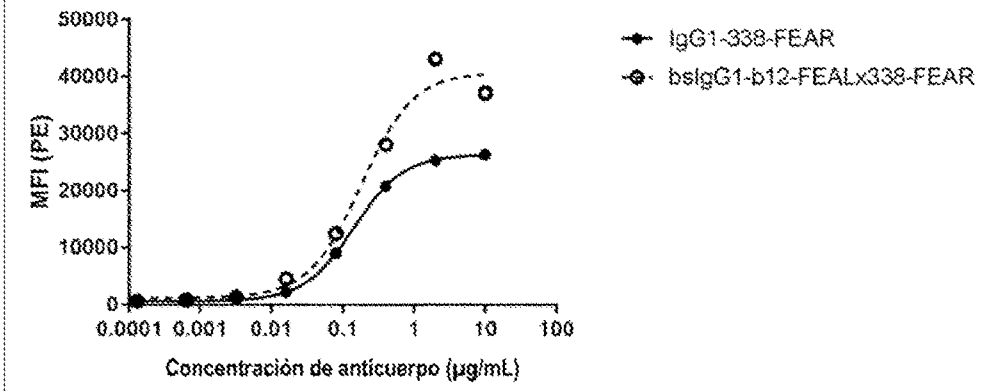
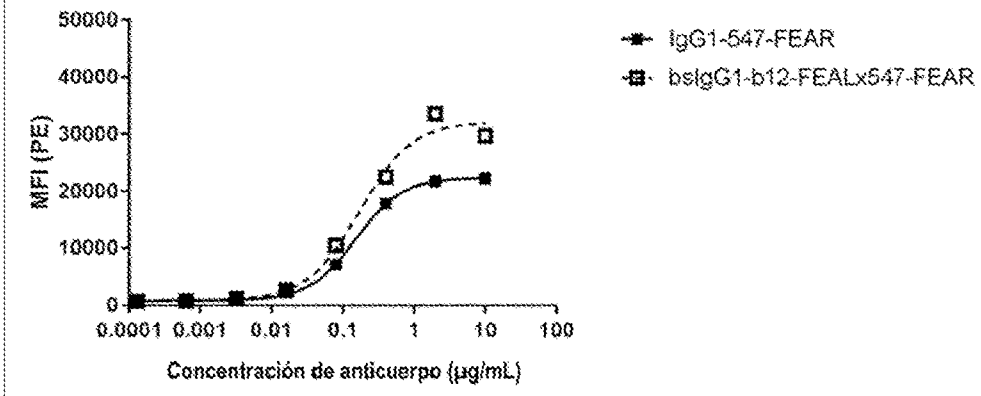

2500
2000
1500
1000
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-511-LC338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx511-LC338-FEAR

Figura 3

A


50000
40000
30000
20000
10000
0
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-338-FEAR
bsIgG1-b12-FEALx338-FEAR

B


50000
40000
30000
20000
10000
0
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-547-FEAR
bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR

C

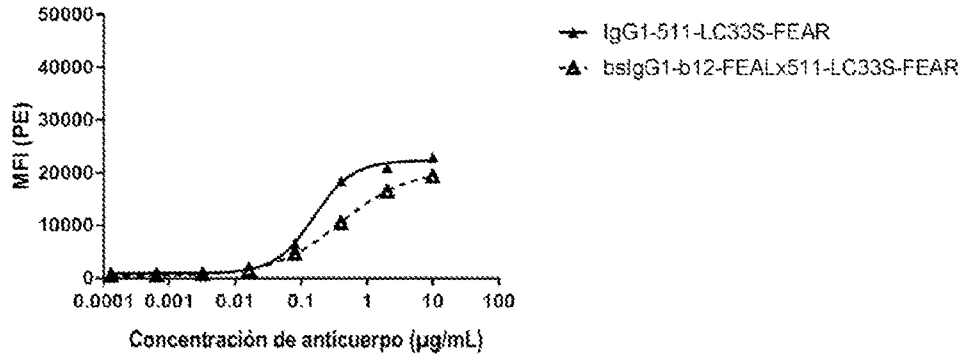
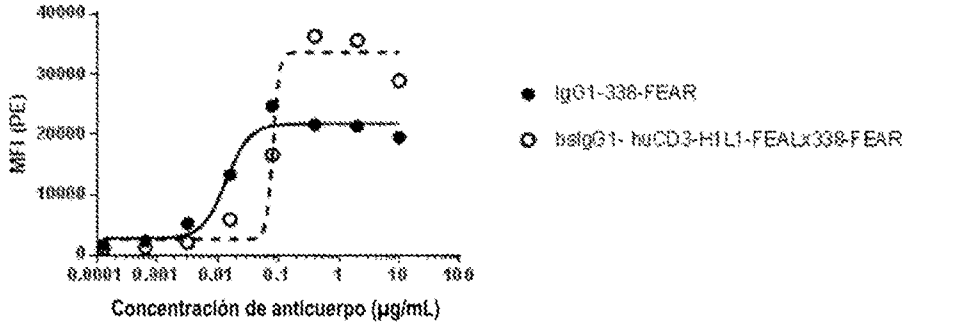
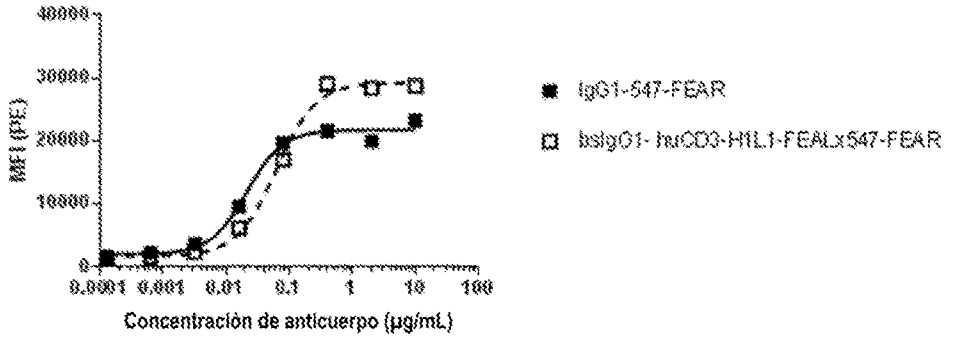

50000
40000
30000
20000
10000
0
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-511-LC33S-FEAR
bsIgG1-b12-FEALx511-LC33S-FEAR

Figura 4

A


40000
30000
20000
10000
0
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR

B


40000
30000
20000
10000
0
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-547-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR

C

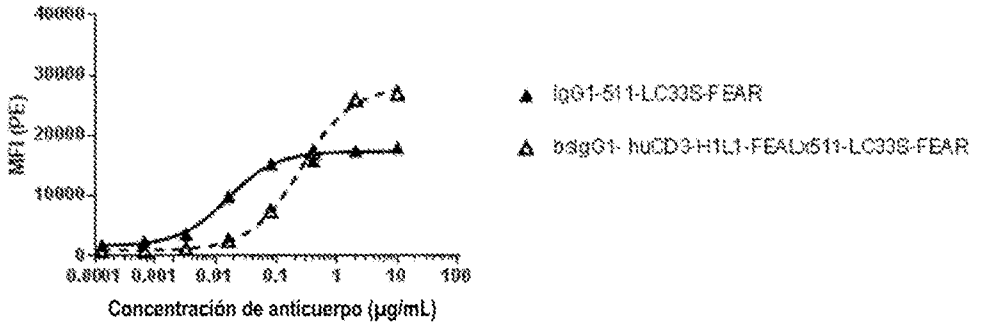
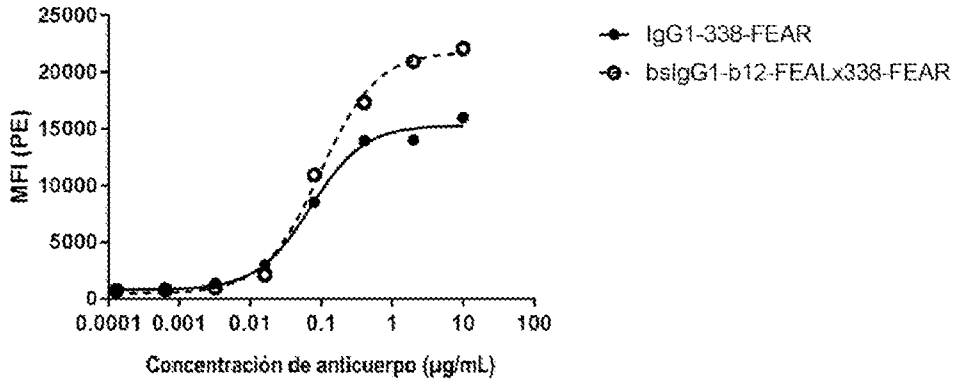
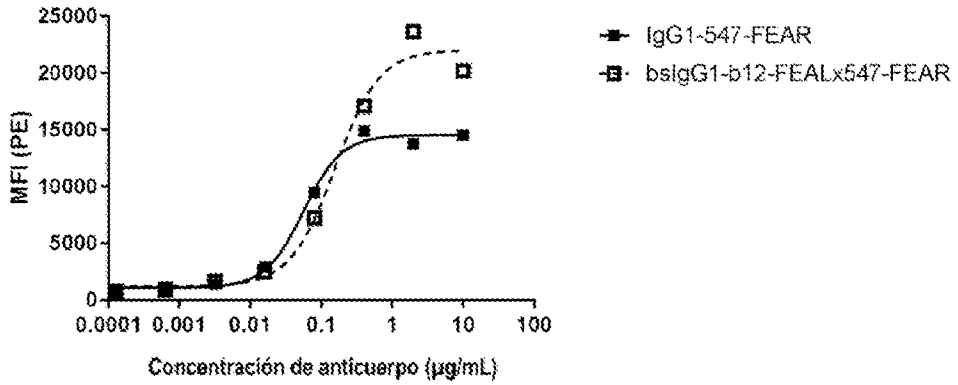

40000
30000
20000
10000
0
MFI (PE)
0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-511-LC33S-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR

Figura 5

D



E



F

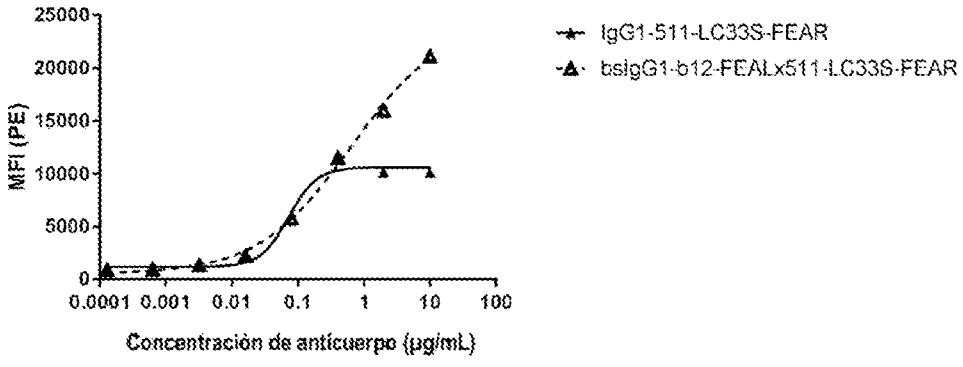


Figura 5, continuación

Anticuerpo	321	MEDI	338	MPDL	421-LC19S	547	511-LC-33S	476-N101Q-LC33S	632	516
321	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	*	0.6	0.6
MEDI	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	*	1.2	1.2
338	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	*	0.6	0.6
MPDL	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	*	1.0	**0.0**
421-LC91S	**-0.1**	**0.0**	**-0.1**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	0.3	0.4	0.2	**0.0**
547	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**0.0**	0.7	0.8	0.7	0.7
511-LC33S	**0.0**	**0.0**	**0.0**	**-0.1**	0.6	0.6	**0.0**	**0.0**	**0.0**	0.6
476-N101Q-LC33S	*	*	*	*	0.8	0.7	**0.0**	**0.0**	**0.0**	0.7
632	0.6	0.5	0.6	0.4	0.6	0.6	**0.0**	**0.0**	**0.0**	0.6
516	1.1	1.0	1.1	**0.0**	**-0.1**	0.8	1.1	1.2	1.1	**0.0**

A

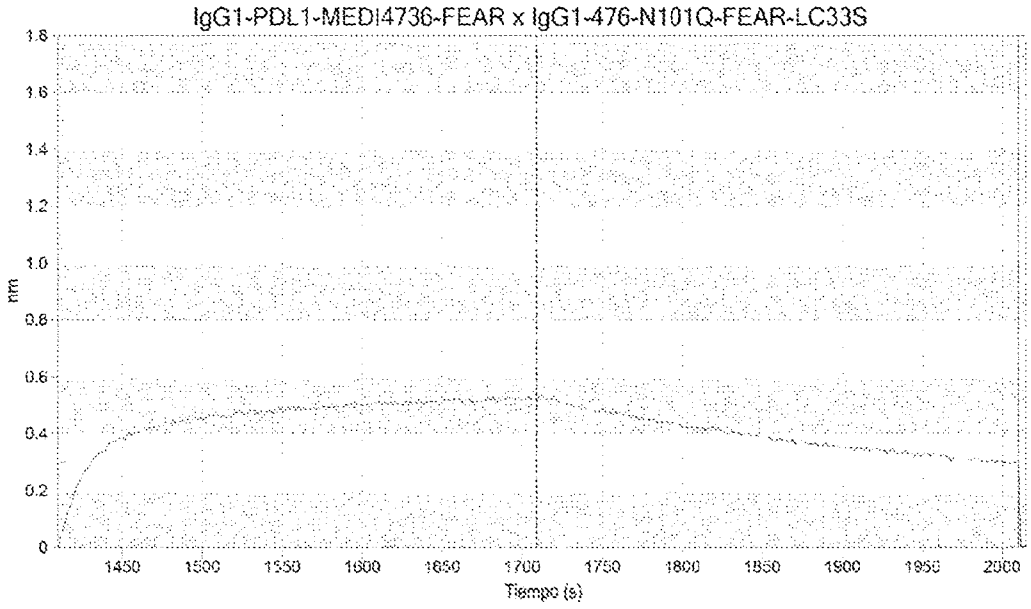
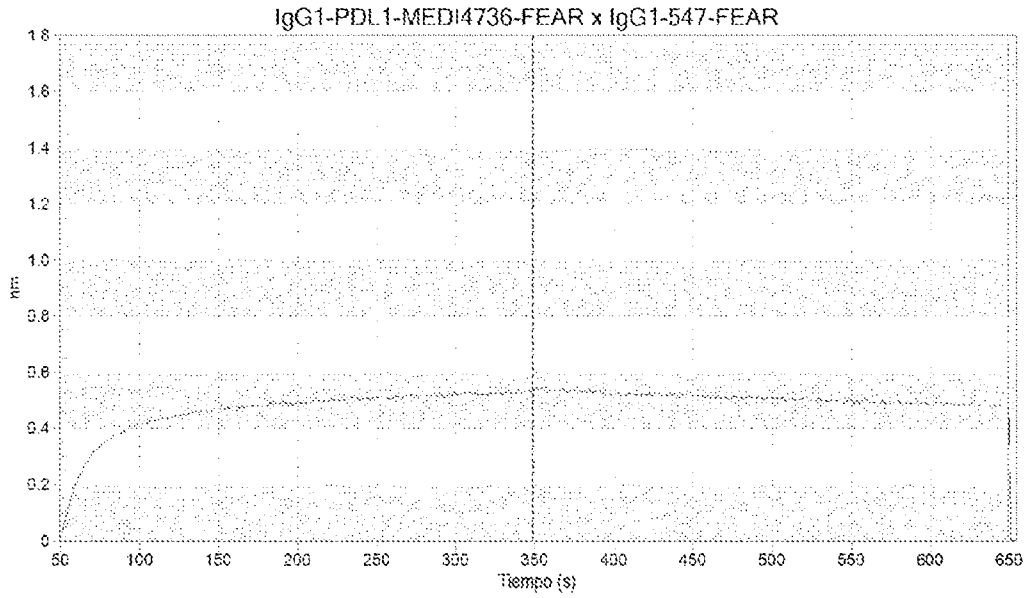


Figura 6

B



C

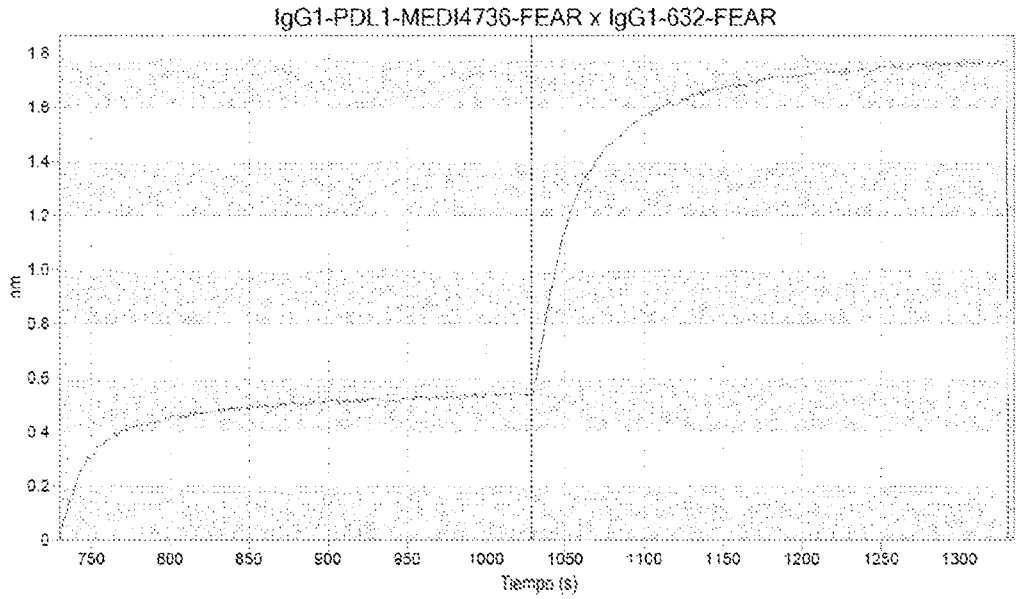
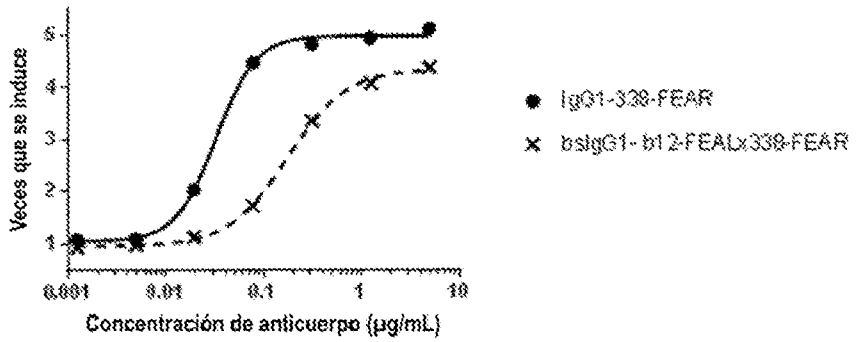
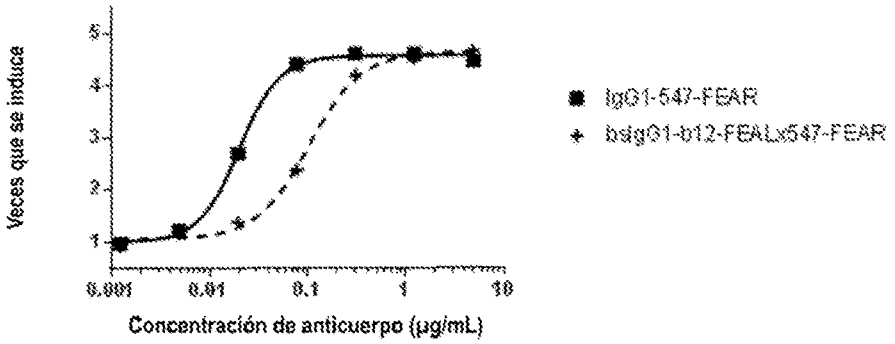


Figura 6, continuación

A


Veces que se induce
1
2
3
4
5
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-338-FEAR
bsIgG1- b12-FEALx338-FEAR

B


Veces que se induce
1
2
3
4
5
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-547-FEAR
bsIgG1-b12-FEALx547-FEAR

C

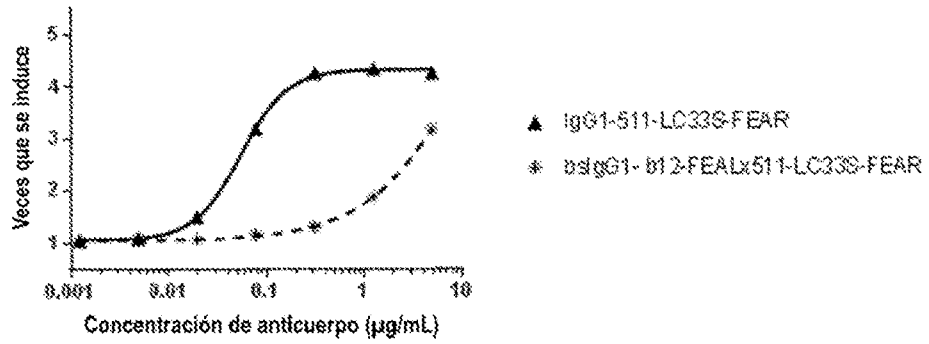
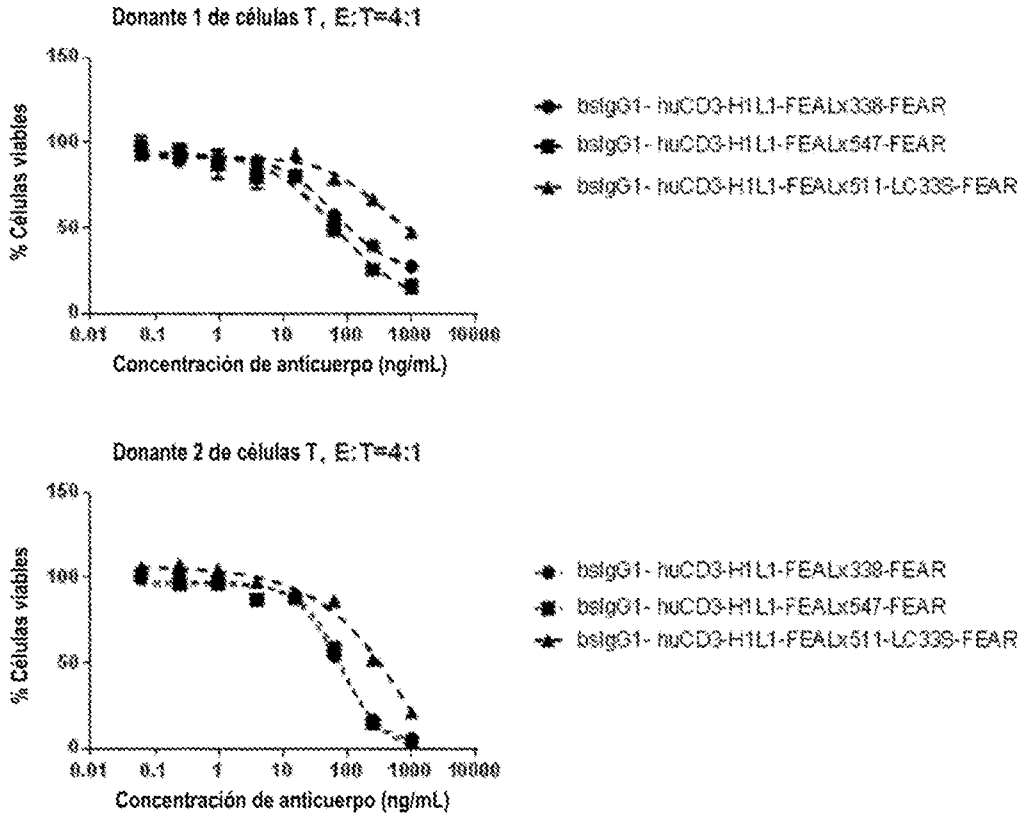

Veces que se induce
1
2
3
4
5
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-511-LC33S-FEAR
bsIgG1- b12-FEALx511-LC33S-FEAR

Figura 7

A


Donante 1 de células T, E:T=4:1
% Células viables
Concentración de anticuerpo (ng/mL)
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR
Donante 2 de células T, E:T=4:1
% Células viables
Concentración de anticuerpo (ng/mL)
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR

B

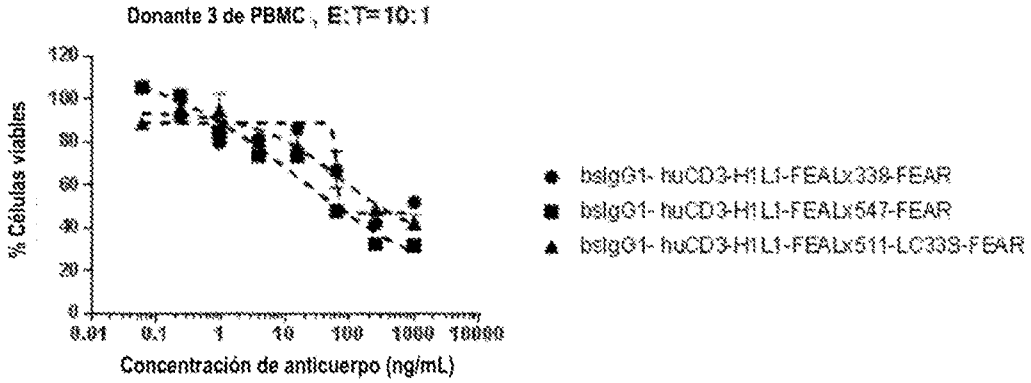

Donante 3 de PBMC, E:T=10:1
% Células viables
Concentración de anticuerpo (ng/mL)
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1- huCD3-H1L1-FEALx511-LC33S-FEAR

Figura 8

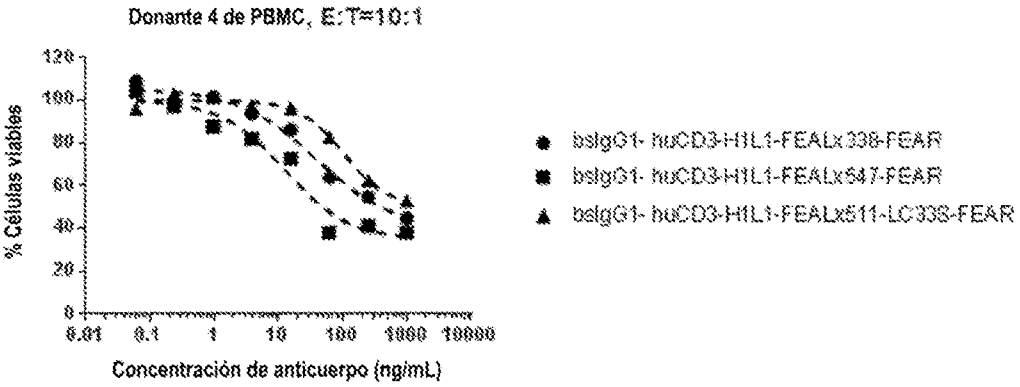
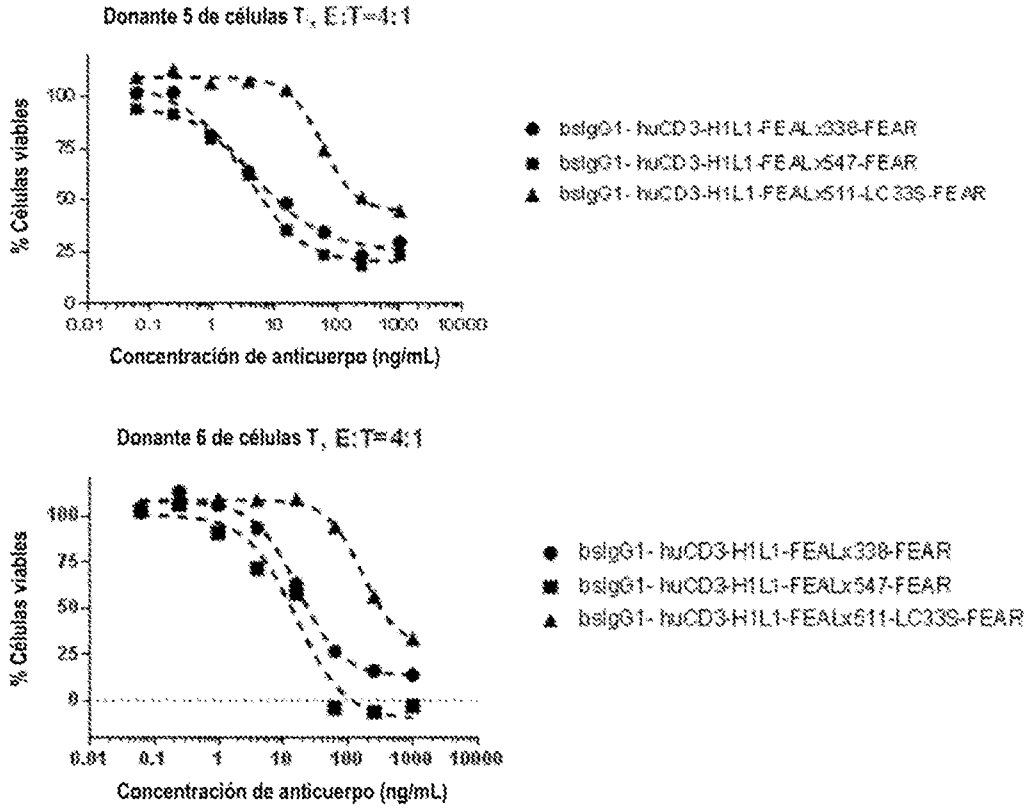


Figura 8, continuación

A


Donante 5 de células T, E:T=4:1
% Células viables
Concentración de anticuerpo (ng/mL)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC338-FEAR
Donante 6 de células T, E:T=4:1
% Células viables
Concentración de anticuerpo (ng/mL)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC338-FEAR

B

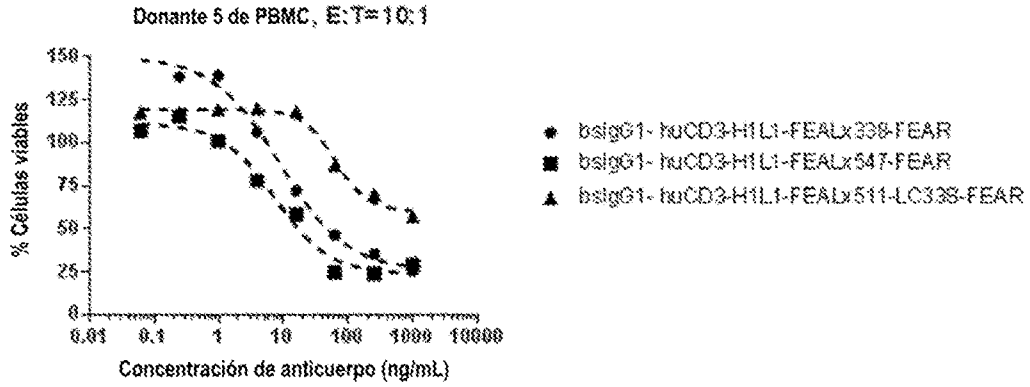

Donante 5 de PBMC, E:T=10:1
% Células viables
Concentración de anticuerpo (ng/mL)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC338-FEAR

Figura 9

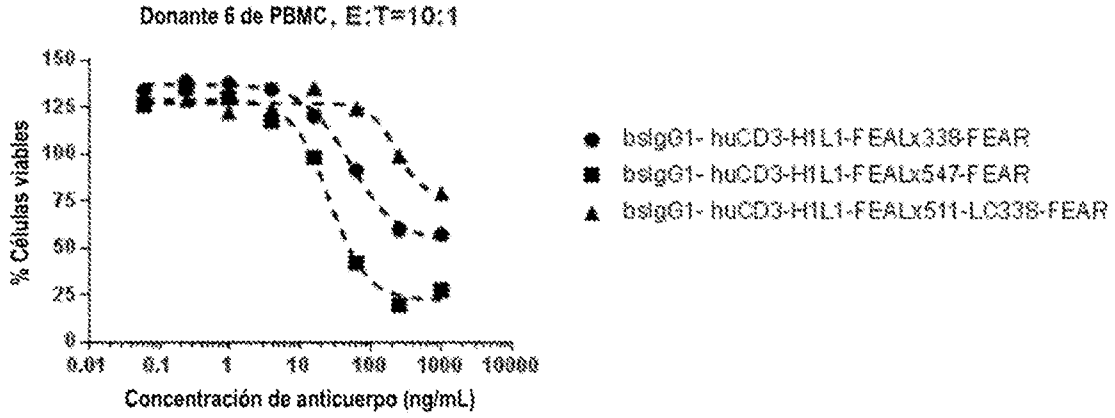
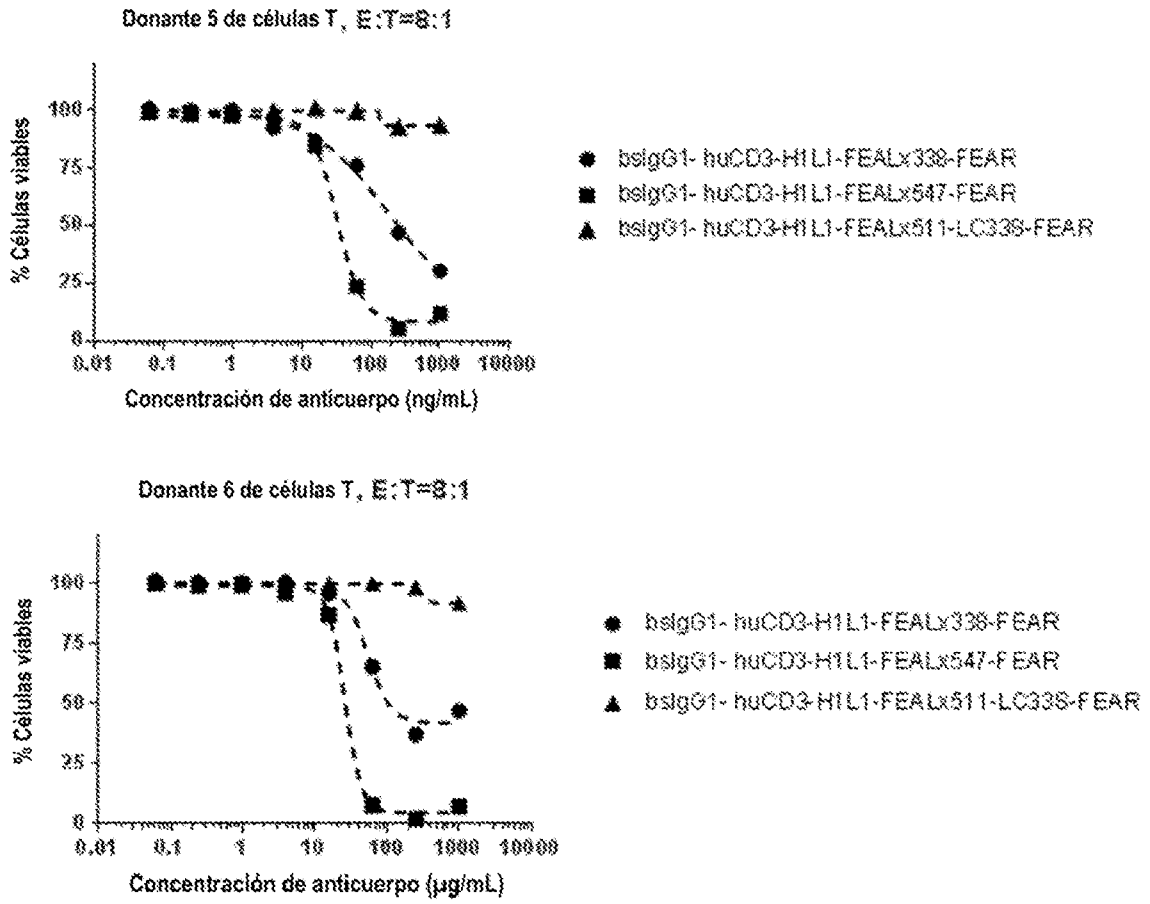


Figura 9, continuación

A


Donante 5 de células T, E:T=8:1
% Células viables
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración de anticuerpo (ng/mL)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC338-FEAR
Donante 6 de células T, E:T=8:1
% Células viables
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC338-FEAR

B

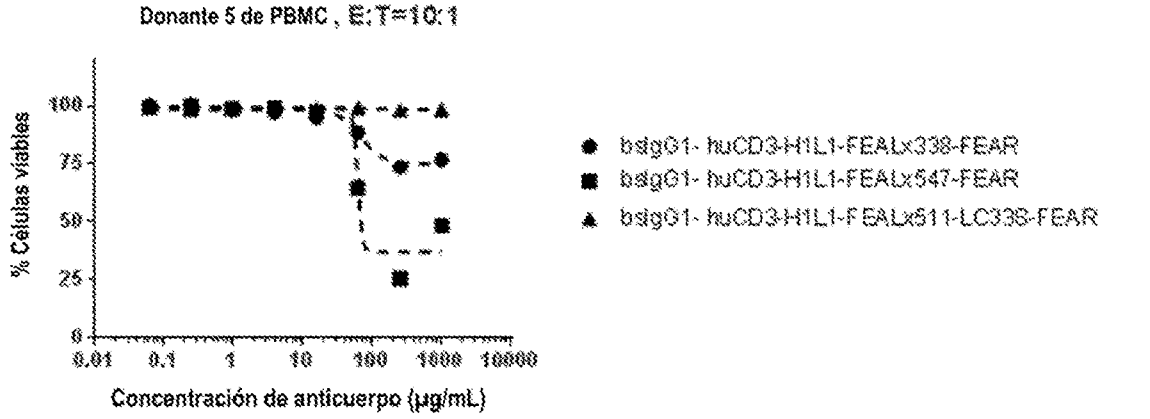

Donante 5 de PBMC, E:T=10:1
% Células viables
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx338-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx547-FEAR
bsIgG1-huCD3-H1L1-FEALx511-LC338-FEAR

Figura 10

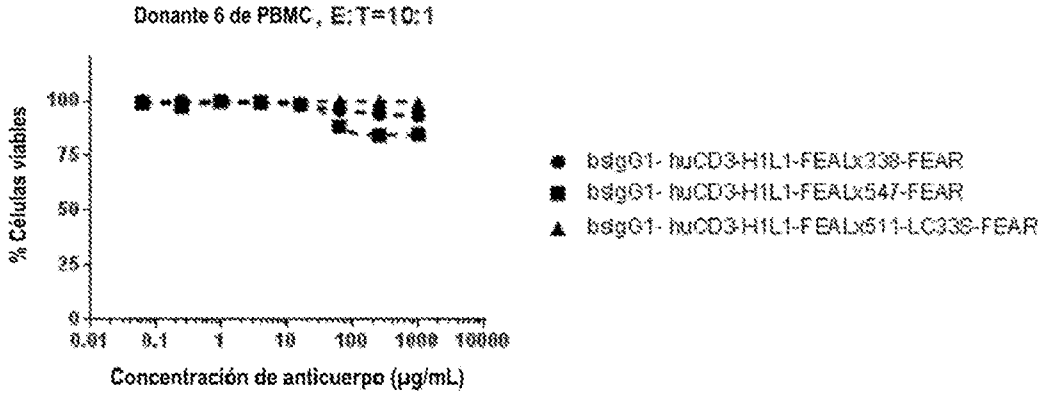
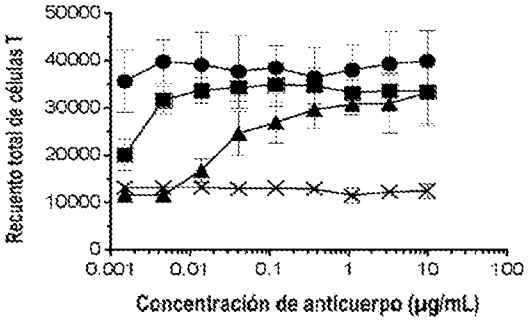
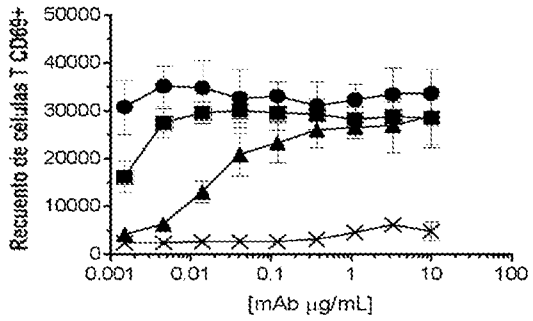


Figura 10, continuación

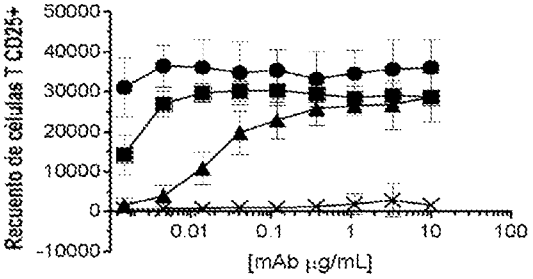
A



B



C



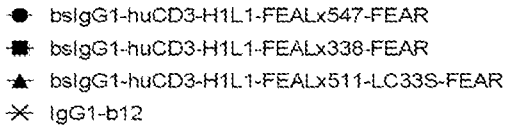


Figura 11

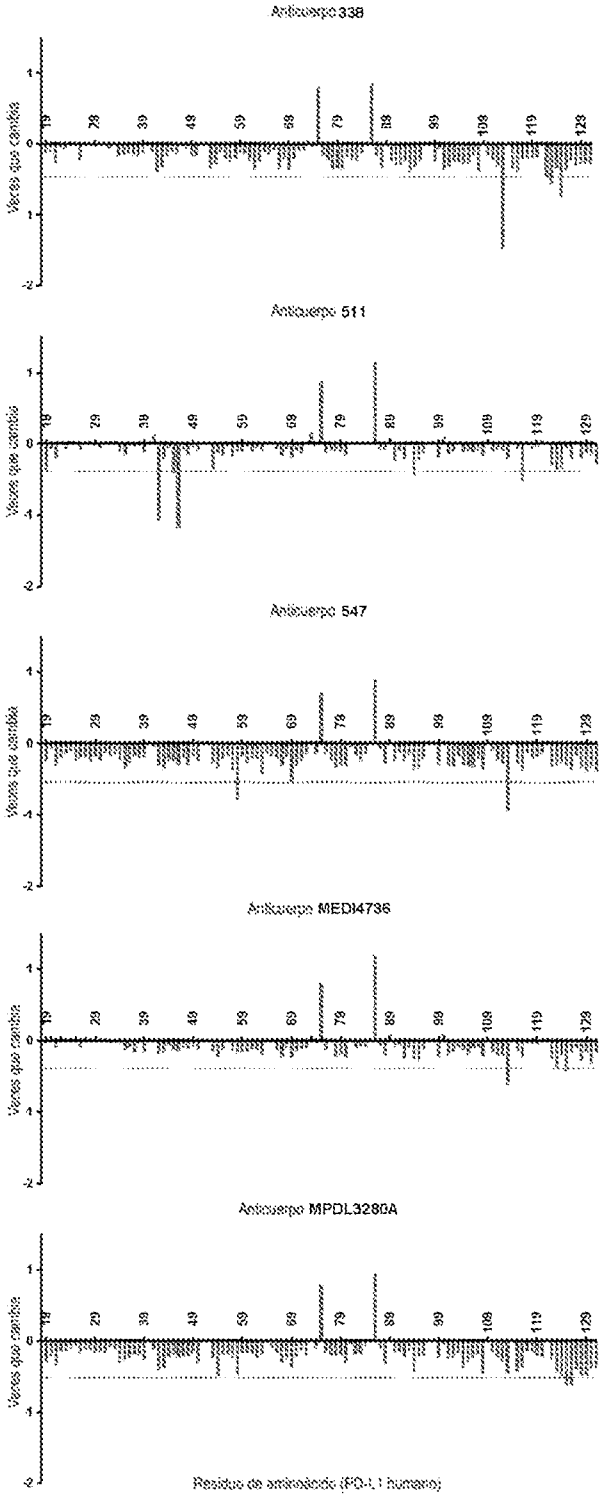

Anticuerpo 338
Anticuerpo 511
Anticuerpo 547
Anticuerpo MEDI4736
Anticuerpo MPDL3280A
Veces que cambia
Residuo de aminoácido (PD-L1 humano)

Figura 12

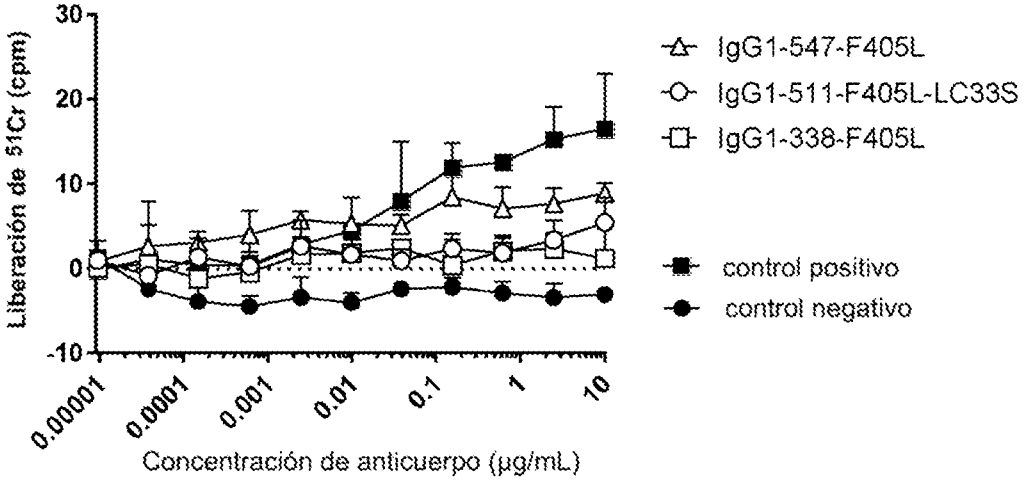

Liberación de 51Cr (cpm)
30
20
10
0
-10
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
Concentración de anticuerpo (µg/mL)
IgG1-547-F405L
IgG1-511-F405L-LC33S
IgG1-338-F405L
control positivo
control negativo

Figura 13

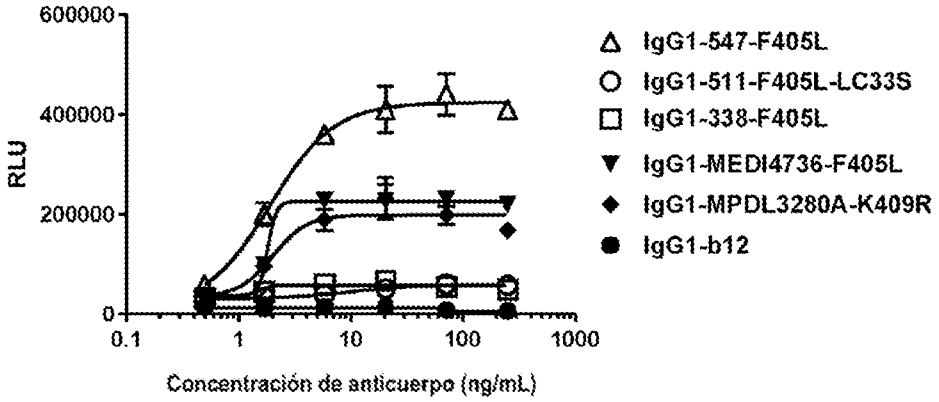

600000
400000
200000
0
RLU
0.1
1
10
100
1000
Concentración de anticuerpo (ng/mL)
IgG1-547-F405L
IgG1-511-F405L-LC33S
IgG1-338-F405L
IgG1-MEDI4736-F405L
IgG1-MPDL3280A-K409R
IgG1-b12

Figura 14