

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 109**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2009** **E 18175924 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 3530672**

54 Título: **Anticuerpos anti PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

26.09.2008 US 100534 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
14.10.2024

73 Titular/es:

DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(50.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US y
EMORY UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

FREEMAN, GORDAN, J.;
AHMED, RAFI;
JONES, TIMOTHY, D.;
CARR, FRANCIS, J. y
GREGGSON, JAMES, P.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 982 109 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

Para que los linfocitos T respondan a polipéptidos exógenos, deben proporcionarse al menos dos señales a través de células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) a linfocitos T inactivos (Jenkins, M. y Schwartz, R. (1987) *J. Exp. Med.* 165:302-319; Mueller, D. L. *et al.* (1990) *J. Immunol.* 144:3701-3709). La primera señal, que confiere especificidad a la respuesta inmunitaria, se transduce mediante el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) después del reconocimiento del péptido antigénico exógeno presentado en el contexto del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC, por sus siglas en inglés). La segunda señal, denominada coestimulación, induce a los linfocitos T a proliferar y a volverse funcionales (Lenschow *et al.* (1996) *Annu. Rev. Immunol.* 14:233). La coestimulación no es específica de antígeno, ni limitada al MHC, y se proporciona por moléculas de superficie celular distintas expresadas por las APC (Jenkins, M. K. *et al.* (1988) *J. Immunol.* 140:3324-3330; Linsley, P. S. *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:721-730; Gimmi, C. D. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6575-6579; Young, J. W. *et al.* (1992) *J. Clin. Invest.* 90:229-237; Koulova, L. *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:759-762; Reiser, H. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:271-275; van-Seventer, G. A. *et al.* (1990) *J. Immunol.* 144:4579-4586; LaSalle, J. M. *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:774-80; Dustin, M. I. *et al.* (1989) *J. Exp. Med.* 169:503; Armitage, R. J. *et al.* (1992) *Nature* 357:80-82; Liu, Y. *et al.* (1992) *J. Exp. Med.* 175:437-445).

Las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) son moléculas coestimuladoras críticas (Freeman *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174:625; Freeman *et al.* (1989) *J. Immunol.* 143:2714; Azuma *et al.* (1993) *Nature* 366:76; Freeman *et al.* (1993) *Science* 262:909). B7-2 desempeña una función predominante durante las respuestas inmunitarias primarias, mientras que B7-1, que está regulada positivamente después durante una respuesta inmunitaria, puede ser importante para prolongar las respuestas de los linfocitos T primarios o coestimular respuestas de linfocitos T secundarios (Bluestone (1995) *Immunity* 2:555).

CD28 es un ligando tanto para B7-1 como para B7-2 que se expresa de manera constitutiva en linfocitos T inactivos y aumenta en la expresión después de la activación de linfocitos T. La ligadura de CD28 junto con una señal TCR produce la transducción de una señal coestimuladora que induce a los linfocitos T a proliferar y segregar IL-2 (Linsley, P. S. *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 173:721-730; Gimmi, C. D. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6575-6579; June, C. H. *et al.* (1990) *Immunol. Today* 11:211-6; Harding, F. A. *et al.* (1992) *Nature* 356:607-609). Un segundo ligando B7-1 y B7-2, CTLA-4 (CD152), es homólogo a CD28, pero no se expresa en linfocitos T inactivos. La expresión de CTLA-4 se produce después de la activación de linfocitos T (Brunet, J. F. *et al.* (1987) *Nature* 328:267-270). La ligadura de CTLA-4 da como resultado la transducción de una señal inhibidora que impide la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas. Por lo tanto, CTLA-4 es un regulador negativo crítico de respuestas de linfocitos T (Waterhouse *et al.* (1995) *Science* 270:985) (Allison y Krummel (1995) *Science* 270:932). El tercer miembro de la familia CD28 a descubrir es ICOS (Hutloff *et al.* (1999) *Nature* 397:263; documento WO 98/38216). La ligadura de ICOS con su ligando (ICOS-L) produce altos niveles de expresión de citocinas, pero una expansión limitada de linfocitos T (Riley J. L. *et al.* (2001) *J. Immunol.* 166:4943-48; Aicher A. *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:4689-96; Mages H. W. *et al.* (2000) *Eur. J Immunol.* 30:1040-7; Brodie D. *et al.* (2000) *Curr. Biol.* 10:333-6; Ling V. *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:1653-7; Yoshinaga S. K. *et al.* (1999) *Nature* 402:827-32). Si los linfocitos T se estimulan a través del receptor de linfocitos T en ausencia de una señal coestimuladora, se vuelven insensibles, anérgicos o mueren.

La importancia de la vía coestimuladora B7:CD28/CTLA-4/ICOS se ha demostrado *in vitro* y en varios sistemas modelo *in vivo*. El bloqueo de esta vía coestimuladora produce el desarrollo de tolerancia específica de antígeno en sistemas murinos y humanos (Harding, F. A. *et al.* (1992) *Nature* 356:607 609; Lenschow, D. J. *et al.* (1992) *Science* 257:789 792; Turka, L. A. *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102 11105; Gimmi, C. D. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6586 6590; Boussiotis, V. *et al.* (1993) *J. Exp. Med.* 178:1753 1763). En cambio, la expresión de B7 por células tumorales murinas B7 negativas induce la inmunidad específica mediada por linfocitos T acompañada por rechazo de tumor y protección prolongada a exposición tumoral (Chen, L. *et al.* (1992) *Cell* 71:1093 1102; Townsend, S. E. y Allison, J. P. (1993) *Science* 259:368 370; Baskar, S. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:5687 5690). Por lo tanto, la manipulación de las vías coestimuladoras ofrece un gran potencial para estimular o suprimir las respuestas inmunitarias en los seres humanos.

El descubrimiento de más miembros de las familias B7-1 y CD28 ha revelado vías adicionales que proporcionan señales secundarias coestimuladoras e inhibidoras a los linfocitos T. Una de las vías más novedosas está representada por el receptor de muerte programada 1 (PD-1; también conocido como CD279) y sus ligandos, PD-L1 (B7-H1; CD274) y PD-L2 (B7-DC; CD273). PD-1 es un miembro de la familia CD28/CTLA-4 que se expresa en linfocitos T activados, pero no en los inactivos (Nishimura *et al.* (1996) *Ent. Immunol.* 8:773). La ligadura de PD-1 mediante sus ligandos media en una señal inhibidora que da como resultado la producción reducida de citocinas, y la supervivencia reducida de linfocitos T (Nishimura *et al.* (1999) *Immunity* 11:141; Nishimura *et al.* (2001) *Science* 291:319; Chemnitz *et al.* (2004) *J. Immunol.* 173:945).

PD-L1 es un miembro de la familia B7 que se expresa en muchos tipos de células, incluyendo APC y linfocitos T activados (Yamazaki *et al.* (2002) J. Immunol. 169:5538). PD-L1 se une tanto a PD-1 como a B7-1. Tanto la unión de B7-1 expresada en linfocitos T por PD-L1 como la unión de PD-L1 expresada en linfocitos T por B7-1 dan como resultado la inhibición de los linfocitos T (Butte *et al.* (2007) Immunity 27:111). También hay evidencia de que, al igual que otros miembros de la familia B7, PD-L1 también puede proporcionar señales coestimuladoras a los linfocitos T (Subudhi *et al.* (2004) J. Clin. Invest. 113:694; Tamura *et al.* (2001) Blood 97:1809).

PD-L2 es un miembro de la familia B7 expresado en diversas APC, incluyendo las células dendríticas, macrófagos y mastocitos procedentes de médula ósea (Zhong *et al.* (2007) Eur. J. Immunol. 37:2405). La PD-L2 expresada en APC es capaz tanto de inhibir la activación de linfocitos T mediante la ligadura de PD-1 como de coestimular la activación de linfocitos T, a través de un mecanismo independiente de PD-1 (Shin *et al.* (2005) J. Exp. Med. 201:1531). Además, la ligadura de PD-L2 expresada en células dendríticas da como resultado una mejor expresión y supervivencia de citocinas de células dendríticas (Radhakrishnan *et al.* (2003) J. Immunol. 37:1827; Nguyen *et al.* (2002) J. Exp. Med. 196:1393). La estructura y expresión de PD-1, PD-L1 y PD-L2, así como las características y funciones de señalización de estas moléculas en el contexto de la regulación de la activación y tolerancia de los linfocitos T (por ejemplo, efectos terapéuticos) se revisan con mayor detalle en Kier *et al.* (2008) Ann. Rev. Immunol. 26:677. La manipulación de esta y otras vías coestimuladoras ofrece un gran potencial para estimular o suprimir respuestas inmunitarias en los seres humanos y existe la necesidad de composiciones y métodos útiles para efectuar tales manipulaciones. El documento WO2008/083174 describe la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto mediante la administración de un antagonista de PD-1 junto con linfocitos T activados, una molécula antigénica de un patógeno o un antígeno tumoral.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la generación y el aislamiento de anticuerpos monoclonales humanos compuestos para su uso como se define en las reivindicaciones que se unen específicamente a PD-L1 humana, así como la caracterización de dichos anticuerpos novedosos y la demostración de su valor terapéutico en el tratamiento de una diversidad de afecciones mediadas por PD-L1. Las técnicas habituales usadas para humanizar anticuerpos murinos producen con frecuencia anticuerpos humanizados que tienen afinidades de unión a antígeno reducidas en comparación con los anticuerpos murinos originales (Almagro y Fransson (2008) Frontiers in Bioscience 13:1619-1633; Foote y Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499; Hwang *et al.* (2005) Methods 36: 35-42). Sorprendentemente, se ha observado que los anticuerpos humanos compuestos de la presente invención se unen a PD-L1 con afinidades muy próximas a las de los anticuerpos murinos. Además, las técnicas de humanización convencionales producen anticuerpos humanizados que conservan alguna secuencia murina. Como resultado, dichos anticuerpos pueden conservar inmunogenicidad cuando se administran a seres humanos. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado CAMPATH® provoca inmunogenicidad en aproximadamente el 50 % de los pacientes. Los anticuerpos humanos compuestos de la presente invención, por otro lado, proceden completamente de secuencias de origen humano. Por lo tanto, es probable que sean significativamente menos inmunogénicos y más eficaces terapéuticamente y útiles cuando se administran a pacientes humanos que otros anticuerpos anti PD-L1 humana. Por consiguiente, los anticuerpos humanos compuestos de la presente invención proporcionan un medio mejorado para tratar y prevenir trastornos mediados por PD-L1, atribuible en parte a su única especificidad, afinidad, estructura, actividad funcional y el hecho de que proceden de secuencias de anticuerpos humanos. La presente invención se basa en el descubrimiento de nuevas aplicaciones terapéuticas, incluyendo el tratamiento de enfermedades infecciosas persistentes y cánceres, mediante la administración de los anticuerpos humanos compuestos descritos en el presente documento.

En el presente documento se divulga, pero no se reivindica explícitamente en estos términos, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-1, una proteína PD-L1 o una proteína PD-L2 (tal como la proteína humana PD-1, PD-L1 o PD-L2), en donde el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado, humano compuesto o humano, y que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis secuencias CDR seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 7-24.

También se divulga, pero no se reivindica explícitamente en estos términos, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-1 (tal como una proteína PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2), en donde el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado, humano compuesto o humano, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NO:7-9 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO:7, secuencia CDR2 de SEQ ID NO:8, y secuencia CDR3 de SEQ ID NO:9) y/o una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:10-12 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO:10, secuencia CDR2 de SEQ ID NO:11, y secuencia CDR3 de SEQ ID NO:12).

También se divulga, pero no se reivindica explícitamente en estos términos, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-L1 (tal como una proteína PD-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4), en donde el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado, humano compuesto o humano, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NO:13-15 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO:13, secuencia CDR2 de SEQ ID NO:14, y secuencia CDR3 de SEQ ID NO:15), y/o una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende las SEQ ID NO:16-18 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO:16, secuencia CDR2 de SEQ ID NO:17, y

secuencia CDR3 de SEQ ID NO: 18).

También se divulga, pero no se reivindica, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-L2 (tal como una proteína PD-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6), en donde el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado, humano compuesto o humano, que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende las SEQ ID NO:19-21 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO:19, secuencia CDR2 de SEQ ID NO:20, y secuencia CDR3 de SEQ ID NO:21), y/o una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:22-24 (secuencia CDR1 de SEQ ID NO:22, secuencia CDR2 de SEQ ID NO:23, y secuencia CDR3 de SEQ ID NO:24).

También se divulga, pero no se reivindica explícitamente en estos términos, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-1, una proteína PD-L1 o una proteína PD-L2 (tal como la proteína humana PD-1, PD-L1 o PD-L2), en donde el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto y/o humano, y que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25-29, 34-38 o 43-47 o una secuencia con al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más de homología idéntica con la SEQ ID NO: 25-29, 34-38 o 43-47, y/o una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 30-33, 39-42 o 48-51, o una secuencia con al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más de homología con la SEQ ID NO: 30-33, 39-42 o 48-51.

También se divulga, pero no se reivindica, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, en donde el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto o humano, y que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25-29, o una secuencia con al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más de identidad u homología con la SEQ ID NO: 25-29, y/o una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 30-33, o una secuencia con al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más de identidad u homología con la SEQ ID NO: 30-33. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 27 o 28, y una secuencia de región variable de cadena ligera de las SEQ ID NO: 32 o 33. En algunos aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 28, y una secuencia de región variable de cadena ligera de las SEQ ID NO: 32.

La invención proporciona un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso como se define en las reivindicaciones, que se une a una proteína PD-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, en donde el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es un anticuerpo humano compuesto o fragmento de unión a antígeno del mismo, y que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 34-38 y una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 39-42. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 35 o 37, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 39, 40 o 42. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 35, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 42.

También se divulga, pero no se reivindica, un anticuerpo aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6, en donde el anticuerpo aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado, compuesto o humano, y que comprende una secuencia de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 43-47, o una secuencia con al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más de identidad u homología con la SEQ ID NO: 43-47, y/o una secuencia de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 48-51, o una secuencia con al menos aproximadamente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 % o más de identidad u homología con la SEQ ID NO: 48-51. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 44 o 46, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 49, 50 o 51. En algunos aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 46, y una secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 51.

Otro aspecto de la divulgación que no se reivindica es un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-1, en donde el anticuerpo aislado inhibe la unión del anticuerpo EH12.2H7 biotinilado a Fc-PD-1 en un ensayo ELISA competitivo. Una realización de la invención es un anticuerpo aislado descrito en el presente documento para su uso como se define en las reivindicaciones, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-L1, en donde el anticuerpo aislado inhibe la unión del anticuerpo 29E2A3 biotinilado a Fc-PD-L1 en un ensayo ELISA competitivo. También se divulga, pero no se reivindica, un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-L2, en donde el anticuerpo aislado inhibe la unión del anticuerpo 24F.10C12 biotinilado a Fc-PD-L2 en un ensayo ELISA competitivo.

- Otro aspecto de la divulgación que no se reivindica es un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-1, en donde el anticuerpo aislado inhibe una señal mediada por PD-1. Una realización de la invención es un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, para su uso como se define en las reivindicaciones, que se une a una proteína PD-L1, en donde el anticuerpo aislado inhibe una señal mediada por PD-L1. También se divulga, pero no se reivindica, un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-L2, en donde el anticuerpo aislado inhibe una señal mediada por PD-L2.
- En el presente documento se divulga un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25-51, o una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad u homología con la SEQ ID NO: 25-51. También se divulga un vector, célula hospedadora o animal que comprende uno de estos ácidos nucleicos. Otro aspecto es un ácido nucleico que se hibrida, en condiciones rigurosas, con el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 25-51, o una secuencia con al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de homología idéntica con la SEQ ID NO: 25-51.
- La presente divulgación también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento. En algunos aspectos de la presente divulgación, el ácido nucleico está un vector, tal como un vector de expresión. La presente divulgación también proporciona una célula hospedadora que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. En algunos aspectos de la presente divulgación, la célula hospedadora produce los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno. La presente divulgación también proporciona métodos para producir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, que comprende cultivar una célula que produce el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, y recuperar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del cultivo celular.
- La presente divulgación incluye además una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- La presente divulgación abarca un método para reactivar un linfocitos T agotado, que comprende poner en contacto una población de linfocitos T en donde al menos algunas células expresan PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 usando un anticuerpo descrito en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno del mismo, ya sea *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.
- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de la invención puede ser para su uso en un método para tratar a un sujeto que padece una infección persistente, incluyendo una infección vírica, una infección bacteriana, una infección por helmintos o una infección por protozoos, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de la invención puede ser para su uso en un método para tratar el cáncer, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo en donde el anticuerpo aislado induce citotoxicidad mediada por anticuerpos o se modifica para inducir citotoxicidad mediada por anticuerpos o se conjuga con un agente seleccionado del grupo que consiste en una toxina y un agente de formación de imágenes. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno que se une a una PD-L1 puede administrarse al sujeto que tiene un cáncer que sobreexpresa PD-L1. En algunos aspectos no reivindicados de la presente divulgación, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno que se une a una PD-L2 se administra al sujeto que tiene un cáncer que sobreexpresa PD-L2.
- Aspectos adicionales de la presente divulgación pertenecen a un método para tratar a un sujeto que padece asma, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado que se une a una proteína PD-L2 descrita en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- También se divulga un método para tratar a un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria o rechazo de trasplante, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado descrito en el presente documento, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a una proteína PD-L1 o una proteína PD-L2.
- La divulgación también abarca el uso de un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o un polipéptido descrito en el presente documento para la fabricación de un medicamento, tal como un medicamento para tratar cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento en un sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** muestra un diagrama esquemático de vectores de expresión usados para la clonación de las secuencias de inmunoglobulina humana ensambladas de la presente divulgación.

Las **figuras 2A-2E** muestran secuencias de región variable de cadena pesada humanas compuestas (figura 2A, VH1; figura 2B, VH2; figura 2C, VH3; y figura 2D, VH4; figura 2E, VH5) diseñadas para corresponder a las del anticuerpo anti PD-1 humano de ratón, EH12.2H7.

Las **figuras 3A-3D** muestran secuencias de región variable de cadena ligera humanas compuestas (figura 3A, Vk1; figura 3B, Vk2; figura 3C, Vk3; figura 3D, Vk4) diseñadas para corresponder a las del anticuerpo anti PD-1 humano de ratón, EH12.2H7.

Las **figuras 4A-4E** muestran secuencias de región variable de cadena pesada humanas compuestas (figura 4A, VH1; figura 4B, VH2; figura 4C, VH3; figura 4D, VH4; figura 4E, VH5) diseñadas para corresponder a las del anticuerpo anti PD-L1 humano de ratón, 29E.2A3.

Las **figuras 5A-5D** muestran secuencias de región variable de cadena ligera humanas compuestas (figura 5A, Vk1; figura 5B, Vk2; figura 5C, Vk3; figura 5D, Vk4) diseñadas para corresponder a las del anticuerpo anti PD-L1 humano de ratón, 29E.2A3.

Las **figuras 6A-6E** muestran secuencias de región variable de cadena pesada humanas compuestas (figura 6A, VH1; figura 6B, VH2; figura 6C, VH3; figura 6D, VH4; figura 6E, VH5) diseñadas para corresponder a las del anticuerpo anti PD-L2 humano de ratón, 24F.10C12.

Las **figuras 7A-7D** muestran secuencias de región variable de cadena ligera humanas compuestas (figura 7A, Vk1; figura 7B, Vk2; figura 7C, Vk3; figura 7D, Vk4) diseñadas para corresponder a las del anticuerpo anti PD-L2 humano de ratón, 24F.10C12.

Las **figuras 8A-8C** muestran resultados SDS-PAGE de 1 µg de anticuerpos humanos compuestos correspondientes a los anticuerpos anti humanos de ratón, EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12, respectivamente.

Las **figuras 9A-9C** muestran resultados de competición ELISA de anticuerpos humanos correspondientes a y con respecto a los anticuerpos anti humanos de ratón, EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12, respectivamente. En la figura 9A, la unión de los anticuerpos purificados a PD-1 humana se ensayaron mediante ELISA competitivo. Se mezclaron diversas concentraciones de cada anticuerpo (0,06 µg/ml a 8 µg/ml) con una concentración fija de EH12.2H7 biotinilado (40 ng/ml) y se unieron a una placa immulon maxisorb revestida con PD-1. También se detectó la unión mediante estreptavidina-HRP y sustrato OPD. La absorbancia a 490 nm se midió en un lector de placas y esto se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo de prueba. En la figura 9B, la unión de los anticuerpos purificados a PD-L1 humana se ensayaron mediante ELISA competitivo. Se mezclaron diversas concentraciones de cada anticuerpo (0,02 µg/ml a 8 µg/ml) con una concentración fija de 29E.2A3 biotinilado (40 ng/ml) y se unieron a una placa immulon maxisorb revestida con PD-L1. También se detectó la unión mediante estreptavidina-HRP y sustrato OPD. La absorbancia a 490 nm se midió en un lector de placas y esto se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo de prueba. En la figura 9C, la unión de los anticuerpos purificados a PD-L2 humana se ensayaron mediante ELISA competitivo. Se mezclaron diversas concentraciones de cada anticuerpo (0,02 µg/ml a 8 µg/ml) con una concentración fija de 24F.10C12 biotinilado (40 ng/ml) y se unieron a una placa immulon maxisorb revestida con PD-L2. También se detectó la unión mediante estreptavidina-HRP y sustrato OPD. La absorbancia a 490 nm se midió en un lector de placas y esto se representó gráficamente frente a la concentración del anticuerpo de prueba.

Las **figuras 10A-10C** muestran datos de unión de CI_{50} resultantes de análisis de competición ELISA de los anticuerpos humanos compuestos, formados de acuerdo con diferentes combinaciones de cadenas pesada y ligera humanas compuestas diseñadas para corresponder a las de los anticuerpos anti humanos de ratón, EH12.2H7 (figura 10A), 29E.2A3 (figura 10B) y 24F.10C12 (figura 10C), respectivamente. El ensayo se realizó como se describe en la figura 3. La CI_{50} para cada combinación de cadena pesada y ligera se normalizó frente a la CI_{50} del anticuerpo de ratón. SD = Sin datos.

La **figura 11** muestra las secuencias de aminoácidos de PD-1, PD-L1 y PD-L2.

La **figura 12** muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR de algunos de los anticuerpos humanos compuestos descritos en el presente documento.

La **figura 13** muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de algunos de los anticuerpos humanos compuestos descritos en el presente documento.

Las **figuras 14A y 14B** muestran el efecto de un anticuerpo anti PD-1 humanizado y un anticuerpo anti PD-L1 humanizado sobre la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD8 específicos de Gag del VIS *in vitro*. Cada símbolo representa un macaco individual. Los números entre paréntesis representan un factor de aumento en la proliferación en presencia de un Ab bloqueante en comparación con un Ab no bloqueante.

La **figura 15** muestra que el bloqueo de PD-L1 reestablece la proliferación impulsada por antígeno de linfocitos T CD8 intrahepáticos (datos representativos del animal 1564).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona compuestos terapéuticos basados en anticuerpos novedosos para su uso como se define en las reivindicaciones para el tratamiento de una diversidad de trastornos mediados por PD-L1 (por ejemplo, tratamiento de enfermedades infecciosas persistentes y cánceres).

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados

términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada. En la siguiente descripción detallada, las referencias a polipéptidos o anticuerpos "de la invención" (en particular con referencia a las figuras 2 a 7) deben entenderse como referencias a los anticuerpos para su uso de la invención, como se define en las reivindicaciones, y otros polipéptidos o anticuerpos de la divulgación.

Como se usan en el presente documento, los términos "PD-1", "PD-L1" y "PD-L2" incluyen cualquier variante o isoforma que se exprese de manera natural por las células, y/o fragmentos de las mismas, que tengan al menos una actividad biológica del polipéptido de longitud completa, a menos que se defina expresamente de otro modo. Además, la expresión "ligando de PD-1" incluye cualquiera o tanto PD-L1 (Freeman *et al.* (2000) J. Exp. Med. 192:1027) como PD-L2 (Latchman *et al.* (2001) Nat. Immunol. 2:261) y cualquier variante o isoforma que se exprese de manera natural por las células, y/o fragmentos de las mismas, que tengan al menos una actividad biológica de los polipéptidos de longitud completa. Por ejemplo, las secuencias de PD-1, PD-L1 y PD-L2 de diferentes especies, incluyendo seres humanos, se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, Honjo *et al.*, Pat. de EE. UU. N.º 5.629.204, que divulgan secuencias de PD-1 humanas y de ratón; Wood *et al.*, Patente de EE. UU. 7.105.328, que divulgan secuencias de PD-1 humanas; Chen *et al.*, Patente de EE. UU. 6.803.192, que divulgan secuencias de PD-L1 humanas y de ratón; Wood *et al.*, Patente de EE. UU. 7.105.328, que divulgan secuencias de PD-L1 humanas; Freeman *et al.*, Pub. de Pat. de EE. UU. 20020164600, que divulga secuencias de PD-L2 humanas y de ratón).

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, la "porción de unión a antígeno") o cadena sencilla de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o a una porción de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. "Anticuerpos inactivantes" se refiere a anticuerpos que no inducen el sistema del complemento.

La expresión "región hipervariable", "HYR", o "HY", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en cuanto a su secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 muestran la mayor diversidad de las seis HVR y se cree que H3 en particular desempeña un papel único en conferir una especificidad excelente a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.* Immunity 13:37-45 (2000); Johnson y Wu in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada únicamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera. Véanse, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363:446-448 (1993) y Sheriff *et al.*, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

Se usan varias delineaciones de regiones hipervariables que se incluyen en el presente documento. Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las más comúnmente usadas (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere, en cambio, a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). El extremo del bucle CDR-H1 de Chothia, cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 (véase a continuación) dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat ubica las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si tanto 35A como 35B están presentes, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan mediante el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32, 33 o 34	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" de la siguiente manera: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en VL y 26-35B (H1), 50-65, 47-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en VH. Estas regiones hipervariables extendidas son típicamente combinaciones de las definiciones de Kabat y Chothia, que opcionalmente pueden incluir también restos identificados usando la definición de Contacto. Los restos de dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, citado anteriormente para cada una de estas definiciones.

Los restos "marco" o "FR" son aquellos restos de dominio variable distintos de los restos de HVR como se define en el presente documento.

La expresión "numeración de restos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat" y variaciones de la misma, se refiere al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la recopilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, anteriormente. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácidos (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, restos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de los restos según Kabat, puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "patrón".

La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región en el extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define que se extiende desde un resto de aminoácido en la posición Cys226 o desde Pro230, al extremo carboxilo de la misma. La lisina del extremo C (resto 447 de acuerdo con el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo o mediante ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos que no tengan restos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos que tengan una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447. Las regiones Fc de secuencia natural adecuadas para su uso en los anticuerpos de la invención incluyen IgG1 humana, IgG2 (IgG2A, IgG2B), IgG3 e IgG4.

Un "receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo las variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativas de estos receptores, los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor a base de tirosina (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor a base de tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático. (Véase M. Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, se incluyen en el término "FcR" del presente documento.

El término "CDR" se refiere a una región determinante de complementariedad (CDR) de las cuales tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Las CDR contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden regiones de armazón o marco. Las longitudes y los límites exactos de las CDR de la definición están sujetos a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Por lo tanto, las CDR pueden referirse a las de Kabat, Chothia, contacto o a cualquier otra definición límite, incluyendo el sistema de numeración descrito en el presente documento. A pesar de diferentes límites, cada uno de estos sistemas tiene algún grado de superposición en lo que constituyen las denominadas "regiones hipervariables" dentro de las secuencias variables. Por lo tanto, las definiciones de CDR de acuerdo con estos sistemas pueden diferir en cuanto a longitud y áreas límite con respecto a la región marco adyacente. Véanse, por ejemplo, Kabat, Chothia y/o MacCallum *et al.*, (Kabat *et al.*, en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5.^a Edición, U.S. Department of Health and Human Services, 1992; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; y MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol., 1996, 262: 732).

Como se usa en el presente documento, la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, PD-1, PD-L1 y/o PD-L2). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_H, V_L, C_L y C_H1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii)

un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_H y V_L de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544 546), que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas mediante un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_H y V_L, están codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_H y V_L se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véanse, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423 426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879 5883). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios se incluyan en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica y los fragmentos se exploran para determinar su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; xenogénicos, alogénicos o singénicos; o formas modificadas de los mismos (por ejemplo, humanizadas, quiméricas, etc.). Los anticuerpos también pueden ser completamente humanos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención se unen específica o sustancialmente específicamente a polipéptidos PD-1, PD-L1 o PD-L2. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad de unión y que tiene regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal o línea no germinal humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos están producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanas fusionados a una célula inmortalizada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo aislado" pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1, PD-L1 o PD-L2 está sustancialmente libre de anticuerpos que no se unen a PD-1, PD-L1 o PD-L2, respectivamente). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 puede tener reactividad cruzada con otras proteínas PD-1, PD-L1 y/o PD-L2, respectivamente, de diferentes especies. Sin embargo, el anticuerpo siempre se une preferentemente a PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 humanas. Además, un anticuerpo aislado típicamente está sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos. En un aspecto de la presente divulgación, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades por PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 se combinan en una composición bien definida.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que consiste en la CDR de anticuerpos procedentes de mamíferos distintos de seres humanos, y la región FR y la región constante de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado es útil como componente eficaz en un agente terapéutico de acuerdo con la presente divulgación ya que se reduce la antigenicidad del anticuerpo humanizado en el cuerpo humano.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo compuesto" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables que comprenden secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal o de línea no germinal de dos o más regiones variables no relacionadas. Además, la expresión "anticuerpo humano compuesto" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal o de línea no germinal humanas y regiones variables que comprenden secuencias de línea germinal o de línea no germinal humanas de dos o más regiones variables humanas no relacionadas. Un anticuerpo humano compuesto es útil como componente eficaz en un agente terapéutico de acuerdo con la presente invención ya que se reduce la antigenicidad del anticuerpo humano compuesto en el cuerpo humano.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano recombinante" incluye todos los anticuerpos humanos preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo (descrito más adelante en la Sección I), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal y/o de línea no germinal humanas. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque proceden y están relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo heterólogo" se define en relación con el organismo no humano transgénico que produce tal anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la que se encuentra en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico y, generalmente, de una especie distinta a la del animal no humano transgénico.

Como se usa en el presente documento, el término " K_D " pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-7} M, tal como aproximadamente menos de 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso menor cuando se determina mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIACORE 3000 usando PD-1, PD-L1 o PD-L2 humana recombinante como analito y el anticuerpo como ligando, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad de al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 o 10,0 veces o más que su afinidad por unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Como se usa en el presente documento, el término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "patrón de glucosilación" se define como el patrón de unidades de hidratos de carbono que están unidas de manera covalente a una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina. Un patrón de glucosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse como sustancialmente similar a los patrones de glucosilación que se producen de manera natural en anticuerpos producidos por la especie del animal transgénico no humano, donde un experto en la técnica reconocería el patrón de glucosilación del anticuerpo heterólogo como más similar a dicho patrón de glucosilación en la especie del animal transgénico no humano que a la especie de la que se obtuvieron los genes CH del transgén.

Como se usa en el presente documento, la expresión "de origen natural" aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que el ser humano no ha modificado intencionadamente en el laboratorio, es de origen natural.

Como se usa en el presente documento, el término "reordenado" se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en donde un segmento V se posiciona inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio V_H y V_L completo, respectivamente. Un locus de gen de inmunoglobulina reorganizado se puede identificar mediante comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reorganizado tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "no reorganizado" o "configuración de la línea germinal" en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en donde el segmento V no se recombina para estar inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero es, preferentemente, ADN bicatenario.

Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico aislada" en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos (por ejemplo, V_H , V_L , CDR3) que se unen a PD-1, PD-L1 o PD-L2, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o porción de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpo que se unen a antígenos distintos de PD-1, PD-L1 o PD-L2, respectivamente, cuyas otras secuencias pueden flanquear de manera natural el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Las figuras 2-7 corresponden a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que comprenden las regiones variables de cadena pesada (V_H) y cadena ligera (V_L) de los anticuerpos anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos de la presente invención, respectivamente.

En el presente documento también se divulgan, pero no se reivindican explícitamente, "modificaciones de secuencia conservadoras" de las secuencias expuestas en las figuras (por ejemplo, figuras 2-7), incluyendo modificaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente la características de unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contienen la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones nucleotídicas y aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en la secuencia expuesta en las figuras (por ejemplo, figuras 2-7) mediante

técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen aquellas en las que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales

5 básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no

10 esencial predicho en un anticuerpo anti PD-1, anti PD-L1 o anti PD-L2 humano se reemplaza preferentemente por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales.

Como alternativa, en otro aspecto de la presente divulgación que no se reivindica explícitamente, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpos anti PD-1, PD-L1 o

15 PD-L2 humanos, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti PD-1, anti PD-L1 o anti PD-L2 humanos modificados resultantes se pueden cribar para determinar su actividad de unión.

Por consiguiente, los anticuerpos codificados por las secuencias de nucleótidos de región variable de cadena pesada y ligera divulgadas en el presente documento y/o que contienen las secuencias de aminoácidos de región variable de

20 cadena pesada y ligera divulgadas en el presente documento (por ejemplo, figuras 2-7) incluyen anticuerpos sustancialmente similares, pero no reivindicados explícitamente, codificados por o que contienen secuencias similares que se han modificado de forma conservadora. A continuación se proporciona un análisis adicional sobre cómo se pueden generar tales anticuerpos sustancialmente similares basándose en las secuencias (es decir, regiones variables de cadena pesada y ligera) divulgadas en el presente documento (por ejemplo, figuras 2-7).

Además, existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de aminoácidos de una proteína particular y las secuencias de nucleótidos que pueden codificar la proteína, como se define por el código genético (que se muestra a continuación). Asimismo, existe una correspondencia conocida y definida entre la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico particular y la secuencia de aminoácidos codificada por ese ácido nucleico, como se define por

30 el código genético.

CÓDIGO GENÉTICO

Alanina (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
Arginina (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
Asparagina (Asn, N)	AAC, AAT
Ácido aspártico (Asp, D)	GAC, GAT
Cisteína (Cys, C)	TGC, TGT
Ácido glutámico (Glu, E)	GAA, GAG
Glutamina (Gln, Q)	CAA, CAG
Glicina (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
Histidina (His, H)	CAC, CAT
Isoleucina (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
Leucina (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
Lisina (Lys, K)	AAA, AAG
Metionina (Met, M)	ATG
Fenilalanina (Phe, F)	TTC, TTT
Prolina (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
Serina (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
Treonina (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
Triptófano (Trp, W)	TGG
Tirosina (Tyr, Y)	TAC, TAT
Valina (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
Señal finalizadora (fin)	TAA, TAG, TGA

Una característica importante y bien conocida del código genético es su redundancia, por lo que, para la mayoría de los aminoácidos usados para producir proteínas, puede emplearse más de un triplete de nucleótidos codificantes (ilustrado anteriormente). Por lo tanto, varias secuencias de nucleótidos diferentes pueden codificar una secuencia de aminoácidos determinada. Tales secuencias de nucleótidos se consideran funcionalmente equivalentes ya que dan como resultado la producción de la misma secuencia de aminoácidos en todos los organismos (aunque determinados

40 organismos pueden traducir algunas secuencias de manera más eficiente que otras). Además, ocasionalmente, se puede encontrar una variante metilada de una purina o pirimidina en una secuencia de nucleótidos determinada. Tales metilaciones no afectan a la relación de codificación entre el codón de trinucleótidos y el aminoácido correspondiente.

Para los ácidos nucleicos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticos, con inserciones o

45

deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 % o más de los nucleótidos, y más preferentemente al menos aproximadamente el 97 %, 98 %, 99 % o más de los nucleótidos. Como alternativa, existe una homología sustancial cuando los segmentos híbriden en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la cadena.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias va en función del número de posiciones idénticas compartido por las secuencias (es decir, % de identidad = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que se requiere introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en Internet en el sitio web de la empresa GCG), usando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación por hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. También puede determinarse el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:1117 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444 453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en Internet en el sitio web de la empresa GCG), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las secuencias de ácido nucleico y de proteína de la presente invención pueden usarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Estas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403 10. Con el programa NBLAST, pueden realizarse búsquedas BLAST de nucleótidos, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Con el programa XBLAST, pueden realizarse búsquedas BLAST de proteínas, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a la molécula de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389 3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST) (disponibles en Internet en el sitio web del NCBI).

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares o de otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeo de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque a menudo están en una secuencia nativa (excepto sitios de restricción modificados y similares), de cualquier ADNc, genómico o mezclas de los mismos, pueden mutarse, de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para las secuencias codificantes, estas mutaciones, pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas o procedentes de V, D, J, constantes, intercambios naturales y otras secuencias de este tipo descritas en el presente documento (donde "procedentes" indica que una secuencia es idéntica o está modificada a partir de otra secuencia).

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de la transcripción, unido operativamente significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, son contiguas y están en el marco de lectura. Para las secuencias de intercambio, unido operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar una recombinación de intercambio.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son aptos para la replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados

vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente, dado que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la presente divulgación pretende incluir otras formas tales de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichas expresiones pretenden referirse no solo a la célula en cuestión sino también a la descendencia de tal célula. Dado que en generaciones sucesivas pueden producirse algunas modificaciones debido a mutaciones o a influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, ser idéntica a la célula original, pero aun así se incluye en el alcance de la expresión "célula hospedadora", como se usa en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Como se usa en el presente documento, el término "modular" incluye regulación positiva y regulación negativa, por ejemplo, potenciar o inhibir una respuesta.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibir" incluye la disminución, limitación o bloqueo, de, por ejemplo, una acción, función o interacción particulares.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula inmunitaria" se refiere a células que desempeñan una función en la respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias son de origen hematopoyético e incluyen linfocitos, tales como linfocitos B y linfocitos T; linfocitos citolíticos naturales; células mieloides, tal como monocitos, macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "linfocito T" incluye linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. La expresión linfocito T también incluye linfocitos T de tipo 1 auxiliares, linfocitos T de tipo 2 auxiliares, linfocitos T de tipo 17 auxiliares y linfocitos T inhibidores. La expresión "célula presentadora de antígeno" incluye células presentadoras de antígeno profesionales (por ejemplo, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células de Langerhans), así como otras células presentadoras de antígeno (por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, astrocitos, fibroblastos, oligodendrocitos).

Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria" incluye respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T y/o mediadas por linfocitos B que están influenciadas por la modulación de la coestimulación de los linfocitos T. Las respuestas inmunitarias de ejemplo incluyen respuestas de linfocitos T, por ejemplo, producción de citocinas y citotoxicidad celular. Además, la expresión respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que se ven afectadas indirectamente por la activación de linfocitos T, por ejemplo, la producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células sensibles a citocinas, por ejemplo, macrófagos.

Como se usa en el presente documento, el término "coestimular", como se usa con referencia a células inmunitarias activadas, incluye la capacidad de un polipéptido coestimulador de proporcionar una segunda señal mediada por receptor no activador (una "señal coestimuladora") que induce la proliferación y/o la función efectora. Por ejemplo, una señal coestimuladora puede dar como resultado la secreción de citocinas, por ejemplo, en un linfocito T que ha recibido una señal mediada por un receptor de linfocitos T. Las células inmunitarias que han recibido una señal mediada por un receptor celular, por ejemplo, a través de un receptor activador, se denominan en el presente documento "células inmunitarias activadas".

Como se usa en el presente documento, la expresión "señal inhibidora" se refiere a una señal transmitida a través de un receptor inhibidor (por ejemplo, CTLA-4 o PD-1) para un polipéptido en una célula inmunitaria. Tal señal antagoniza una señal a través de un receptor activador (por ejemplo, a través de un polipéptido TCR o CD3) y puede dar como resultado, por ejemplo, la inhibición de la generación de segundos mensajeros; una inhibición de la proliferación; una inhibición de la función efectora en la célula inmunitaria, por ejemplo, fagocitosis reducida, producción reducida de anticuerpos, citotoxicidad celular reducida, la incapacidad de la célula inmunitaria para producir mediadores (tales como citocinas (por ejemplo, IL-2) y/o mediadores de respuestas alérgicas); o el desarrollo de anergia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "falta de respuesta" incluye la refractividad de las células inmunitarias a la estimulación, por ejemplo, estimulación a través de un receptor activador o una citocina. La falta de respuesta puede producirse, por ejemplo, debido a la exposición a inmunosupresores o a altas dosis de antígeno. Como se usa en el presente documento, el término "anergia" o "tolerancia" incluye refractividad a la estimulación mediada por receptor activador. Dicha refractividad es generalmente específica de antígeno y persiste tras haber cesado la exposición al antígeno causante de la tolerancia. Por ejemplo, la anergia en los linfocitos T (a diferencia de

la falta de respuesta) se caracteriza por la falta de producción de citocinas, por ejemplo, IL-2. La anergia de los linfocitos T tiene lugar cuando los linfocitos T se exponen a un antígeno y reciben una primera señal (un receptor de linfocitos T o una señal mediada por CD-3) en ausencia de una segunda señal (una señal coestimuladora). En estas condiciones, la reexposición de las células al mismo antígeno (incluso si la reexposición se produce en presencia de un polipéptido coestimulador) da como resultado una incapacidad para producir citocinas y, por lo tanto, una incapacidad para proliferar. Sin embargo, los linfocitos T anérgicos pueden proliferar si se cultivan con citocinas (por ejemplo, IL-2). Por ejemplo, la anergia de los linfocitos T también se puede observar por la falta de producción de IL-2 por parte de los linfocitos T según lo medido mediante ELISA o mediante un ensayo de proliferación que usa una línea celular indicadora. Como alternativa, se puede usar una construcción de gen indicador. Por ejemplo, los linfocitos T anérgicos no logran iniciar la transcripción del gen IL-2 inducida por un promotor heterólogo bajo el control del potenciador del gen IL-2 5' o por un multímero de la secuencia AP1 que se puede encontrar dentro del potenciador (Kang *et al.* (1992) Science 257:1134).

Como se usa en el presente documento, el término "actividad", cuando se usa con respecto a un polipéptido, por ejemplo, polipéptido PD-1, PD-L1 o PD-L2, incluye actividades que son inherentes a la estructura de la proteína. Por ejemplo, con respecto al ligando de PD-1, el término "actividad" incluye la capacidad de modular la coestimulación de células inmunitarias (por ejemplo, modulando una señal coestimuladora en una célula inmunitaria activada) o de modular la inhibición modulando una señal inhibidora en una célula inmunitaria (por ejemplo, activando un receptor natural en una célula inmunitaria). Los expertos en la técnica reconocerán que cuando un polipéptido del ligando de PD-1 se une a un receptor coestimulador, se puede generar una señal coestimuladora en la célula inmunitaria. Cuando un polipéptido del ligando de PD-1 se une a un receptor inhibidor, se genera una señal inhibidora en la célula inmunitaria. Además, cuando un ligando de PD-1 se une a un polipéptido B7-1, se puede generar una señal inhibidora (Butte *et al.* (2007) Immunity 27:111).

Con respecto a PD-1, el término "actividad" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de modular una señal inhibidora en una célula inmunitaria, por ejemplo, acoplando un ligando natural de PD-1 en una célula presentadora de antígeno. PD-1 transmite una señal inhibidora a una célula inmunitaria de manera similar a CTLA-4. La modulación de una señal inhibidora en una célula inmunitaria da como resultado la modulación de la proliferación de y/o la secreción de citocinas por una célula inmunitaria. Por lo tanto, la expresión "actividad de PD-1" incluye la capacidad de un polipéptido PD-1 de unirse a su ligando o ligandos naturales, la capacidad de modular señales coestimuladoras o inhibidoras de células inmunitarias, y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria.

Como se usa en el presente documento, el término "interacción", cuando se refiere a una interacción entre dos moléculas, se refiere al contacto físico (por ejemplo, unión) de las moléculas entre sí. Generalmente, tal interacción da como resultado una actividad (que produce un efecto biológico) de una o ambas de dichas moléculas. La actividad puede ser una actividad directa de una o ambas moléculas (por ejemplo, transducción de señales). Como alternativa, puede evitarse que una o ambas moléculas en la interacción se unan a un ligando y, por lo tanto, se mantengan inactivas con respecto a la actividad de unión al ligando (por ejemplo, unir su ligando y desencadenar o inhibir la coestimulación). La inhibición de tal interacción da como resultado la interrupción de la actividad de una o más moléculas implicadas en la interacción. Mejorar tal interacción es prolongar o aumentar la probabilidad de dicho contacto físico, y prolongar o aumentar la probabilidad de dicha actividad.

Como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen "que consiste/n en" y/o "que consiste/n esencialmente en" aspectos y realizaciones.

Se describen diversos aspectos de la invención con más detalle en las siguientes subsecciones.

I. Moléculas de ácido nucleico aisladas

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las figuras 2-7) o porciones biológicamente activas de los mismos, así como fragmentos de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos y fragmentos para su uso como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de las moléculas de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generado usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero es, preferentemente, ADN bicatenario.

La expresión "molécula de ácido nucleico aislada" incluye moléculas de ácido nucleico que están separadas de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico. Por ejemplo, en lo que respecta al ADN genómico, el término "aislado" incluye moléculas de ácido nucleico que están separadas del cromosoma con el que el ADN genómico está asociado de manera natural. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico "aislada" está libre de secuencias que flanquean de manera natural el ácido nucleico (es decir, secuencias

ubicadas en los extremos 5' y 3' de la molécula de ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que se obtiene el ácido nucleico. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo, cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

Una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7), o una porción de la misma, se puede aislar usando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que abarca todas o una porción de las secuencias mostradas en las figuras 2-7 se puede aislar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores oligonucleotídicos sintéticos diseñados basándose en las secuencias mostradas en las figuras 2-7.

Una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación se puede amplificar usando ADNc, ARNm o, como alternativa, ADN genómico como plantilla y cebadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con técnicas de amplificación por PCR estándar. La molécula de ácido nucleico así amplificada se puede clonar en un vector apropiado y caracterizarse mediante análisis de secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a secuencias de ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

En otro aspecto de la presente divulgación, una molécula de ácido nucleico aislada de la divulgación comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7), o una porción de la misma. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7), o una porción de la misma, es aquella que es suficientemente complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en las figuras 2-7, de modo que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos respectiva mostrada en las figuras 2-7, formando así un dúplex estable.

En otro aspecto más no reivindicado, una molécula de ácido nucleico aislada de la presente divulgación comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a toda la longitud de la secuencia de nucleótidos mostrada en las figuras 2-7, o una porción de cualquiera de estas secuencias de nucleótidos.

Además, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación puede comprender solo una porción de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7), o una porción de la misma, por ejemplo, un fragmento que se puede usar como sonda o cebador o un fragmento que codifica una porción de un polipéptido de la invención, por ejemplo, los de las figuras 2-7. La sonda/cebador típicamente comprende un oligonucleótido sustancialmente purificado. El oligonucleótido comprende típicamente una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12 o 15, preferentemente aproximadamente 20 o 25, más preferentemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o 75 nucleótidos consecutivos de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7); de una secuencia no codificante de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7); o de un mutante de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7).

Se pueden usar sondas basadas en una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7) para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican los mismos polipéptidos u homólogos. En un aspecto de la presente divulgación, la sonda comprende además un grupo marcador unido a la misma, por ejemplo, el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

Un fragmento de ácido nucleico que codifica una "porción biológicamente activa de un polipéptido de la invención" se puede preparar aislando una porción de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7) que codifica un polipéptido que tiene una actividad biológica de un polipéptido de la invención (por ejemplo, la capacidad de unirse a su diana antigénica), expresando la porción codificada del polipéptido de la invención (por ejemplo, mediante expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la porción codificada del polipéptido de la invención.

También se divulgan en el presente documento moléculas de ácido nucleico que difieren de una o más secuencias de nucleótidos mostradas en las figuras 2-7 debido a la degeneración del código genético y, por lo tanto, codifican los mismos polipéptidos que los codificados por la secuencia de nucleótidos respectiva mostrada en las figuras 2-7. También se divulga una molécula de ácido nucleico aislada de la presente divulgación que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, los de las figuras 2-7).

Las moléculas de ácido nucleico correspondientes a homólogos de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7) se pueden aislar basándose en su homología con los ácidos nucleicos

divulgados en el presente documento usando los ADNc divulgados en el presente documento, o una porción de los mismos, como sonda de hibridación de acuerdo con técnicas de hibridación estándar en condiciones de hibridación rigurosas.

- 5 Por consiguiente, en otro aspecto de la presente divulgación, una molécula de ácido nucleico aislada de la presente divulgación tiene al menos 15, 20, 25, 30 o más nucleótidos de longitud y se hibrida en condiciones rigurosas con la molécula de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7).
- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión "hibrida en condiciones rigurosas" pretende describir condiciones para la hibridación y el lavado bajo las cuales las secuencias de nucleótidos que son significativamente idénticas u homólogas entre sí permanecen hibridadas entre sí. Preferentemente, las condiciones son tales que las secuencias al menos aproximadamente un 70 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 85 % o un 90 % idénticas entre sí permanecen hibridadas entre sí.
- 15 Dichas condiciones rigurosas se conocen por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995), secciones 2, 4 y 6. Se pueden encontrar condiciones rigurosas adicionales en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), capítulos 7, 9 y 11. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación rigurosas incluye la hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 4x o 6x, a aproximadamente 65-70 °C (o
- 20 hibridación en SSC 4x más formamida al 50 % a aproximadamente 42-50 °C) seguida de uno o más lavados en SSC 1x, a aproximadamente 65-70 °C. Un ejemplo adicional no limitante de condiciones de hibridación rigurosas incluye la hibridación en SSC 6x a 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2x, SDS al 0,1 % a 65 °C. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación altamente rigurosas incluye hibridación en SSC 1x, a aproximadamente 65-70 °C (o hibridación en SSC 1x más formamida al 50 % a aproximadamente 42-50 °C) seguida de uno o más lavados
- 25 en SSC 0,3x, a aproximadamente 65-70 °C. Un ejemplo no limitante de condiciones de hibridación de rigurosidad reducida incluye la hibridación en SSC 4x o 6x, a aproximadamente 50-60 °C (o, como alternativa, hibridación en SSC 6x más formamida al 50 % a aproximadamente 40-45 °C) seguida de una o más lavados en 2x, a aproximadamente 50-60 °C. También se pretende que la presente invención abarque intervalos intermedios a los valores mencionados anteriormente, por ejemplo, a 65-70 °C o a 42-50 °C. SSPE (SSPE 1x es NaCl 0,15 M, NaH₂PO₄ 10 mM y EDTA 1,25 mM, pH 7,4) se pueden sustituir por SSC (SSC 1x es NaCl 0,15 M y citrato de sodio 15 mM) en los tampones de
- 30 hibridación y lavado; los lavados se realizan durante 15 minutos después de que se completa cada hibridación. La temperatura de hibridación para los híbridos que se prevé que tiene menos de 50 pares de bases de longitud debe ser de 5-10 °C menos que la temperatura de fusión (T_f) del híbrido, donde T_f se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, T_f (°C) = $2(n.^{\circ} \text{ de A + T bases}) + 4(n.^{\circ} \text{ de G + C bases})$. Para híbridos de entre 18 y 49 pares de bases de longitud, T_f (°C) = $81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0,41(\% \text{ de G+C}) - (600/N)$, donde N es el número de bases en el híbrido, y $[\text{Na}^+]$ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ($[\text{Na}^+]$ para SSC 1x = 0,165 M). El profesional experto también reconocerá que se pueden añadir reactivos adicionales a los tampones de hibridación y/o lavado para disminuir la hibridación no específica de moléculas de ácido nucleico con membranas, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa o nylon, incluyendo, pero sin limitación, agentes
- 40 bloqueantes (por ejemplo, BSA o ADN portador de esperma de salmón o arenque), detergentes (por ejemplo, SDS), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), Ficoll, PVP y similares. Cuando se usan membranas de nylon, en particular, un ejemplo adicional no limitante de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en NaH₂PO₄ 0,25 M-0,5 M, SDS al 7 % a aproximadamente 65 °C, seguida de uno o más lavados en NaH₂PO₄ 0,02 M, SDS al 1 % a 65 °C, véase, por ejemplo, Church y Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995 (o, como alternativa, SSC 0,2x, SDS al 1 %).
- 45

- El experto en la técnica apreciará además que se pueden introducir cambios mediante mutación en una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7), lo que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos codificados de la presente invención, sin alterar la capacidad funcional de los polipéptidos.
- 50 Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en restos de aminoácidos "no esenciales" en una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7). Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que se puede alterar a partir de una molécula de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las figuras 2-7) sin alterar la actividad biológica, mientras que un resto de aminoácido "esencial" es necesario para la actividad biológica. Por ejemplo, se predice que los restos de aminoácidos que se conservan entre los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, los necesarios para la unión de los polipéptidos a su antígeno diana, son particularmente insensibles a la alteración.
- 55

- Por consiguiente, otro aspecto de la presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, los de las figuras 2-7) que contienen cambios en los restos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad. Dichos polipéptidos difieren en la secuencia de aminoácidos de los de las figuras 2-7, pero conservan actividad biológica. En un aspecto de la presente divulgación, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 71 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más idéntica a las de las figuras 2-7.
- 60

65

Se puede crear una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido idéntico a los polipéptidos de los de las figuras 2-7 introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de los de las figuras 2-7 de modo que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos se introducen en el polipéptido codificado. Se pueden introducir mutaciones en moléculas de ácido nucleico de la presente invención (por ejemplo, las de las figuras 2-7) mediante técnicas estándar, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis mediada por PCR. En un aspecto de la presente divulgación, se realizan sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más restos de aminoácidos no esenciales previstos. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la que el resto de aminoácidos se reemplaza por un resto de aminoácidos que tenga una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial previsto en un polipéptido de la invención (por ejemplo, los de las figuras 2-7) se puede reemplazar por otro restos de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Como alternativa, en otro aspecto de la divulgación, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una o más moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7), tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar para determinar la actividad biológica para identificar mutantes que conserven actividad. Después de la mutagénesis de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7), el polipéptido codificado se puede expresar de manera recombinante y se puede determinar la actividad del polipéptido.

En un aspecto de la presente divulgación, se puede analizar la capacidad de un polipéptido mutante de la invención para unirse y/o modular la actividad de un compañero de PD-1 natural (por ejemplo, ligandos de PD-1) o de ligando de PD-1 (por ejemplo, PD-1 y B7-1), modular la señalización intracelular o intercelular, modular la activación de linfocitos T y/o modular la respuesta inmunitaria de un organismo.

Otro aspecto más de la presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican proteínas de fusión. Dichas moléculas de ácido nucleico, que comprenden al menos una primera secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención (por ejemplo, las de las figuras 2-7) unidas operativamente a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención (por ejemplo, las de las figuras 2-7) se pueden preparar mediante técnicas de ADN recombinante estándar.

Las características de expresión de una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7) dentro de una línea celular o microorganismo pueden modificarse insertando un elemento regulador de ADN heterólogo en el genoma de una línea celular estable o microorganismo clonado de manera que el elemento regulador insertado esté unido operativamente con las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7). Por ejemplo, puede insertarse un elemento regulador heterólogo en una línea celular estable o microorganismo clonado, de modo que esté unido operativamente con moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7), usando técnicas, tales como recombinación homóloga dirigida, que se conocen bien por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Chappel, Pat. de EE. UU. N.º 5.272.071; Publicación PCT N.º WO 91/06667, publicada el 16 de mayo de 1991.

II. Moléculas polipeptídicas aisladas

Pueden aislarse los polipéptidos de la presente divulgación (incluyendo los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno para su uso de la invención, como se define en las reivindicaciones, y los de las figuras 2-7), y porciones biológicamente activas de los mismos. En una realización, los polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), y porciones biológicamente activas de los mismos, se pueden aislar de células o fuentes tisulares mediante un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas estándar. Los polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), y porciones biológicamente activas de los mismos, se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante. Como alternativa, los polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), y porciones biológicamente activas de los mismos, se pueden sintetizar químicamente usando técnicas de síntesis de péptidos estándar.

Un polipéptido "aislado" o "purificado" o una porción biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular a partir de la cual se obtienen los polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), o está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de uno o más polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), y porciones biológicamente activas de los mismos, en las que el polipéptido se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de manera recombinante. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de uno o más polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), y porciones biológicamente activas de los mismos, que tienen menos de aproximadamente el 30 % (en peso seco) de proteínas no pertenecientes a la presente divulgación (también

denominadas en el presente documento "proteína contaminante"), más preferentemente menos de aproximadamente el 20 % de proteínas no pertenecientes a la presente divulgación, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 10 % de proteínas no pertenecientes a la presente divulgación, y mucho más preferentemente menos de aproximadamente el 5 % de proteínas no pertenecientes a la presente divulgación. Cuando los polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7) o una porción biológicamente activa de los mismos se producen de manera recombinante, también está preferentemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 10 %, y mucho más preferentemente menos de aproximadamente el 5 % del volumen de la preparación de proteínas.

La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de uno o más polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), o una porción biológicamente activa de los mismos, en las que el polipéptido se separa de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis del polipéptido. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos" incluye preparaciones de uno o más polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), o una porción biológicamente activa de los mismos, que tienen menos de aproximadamente el 30 % (en peso seco) de precursores químicos o de proteínas no pertenecientes a la presente divulgación, más preferentemente menos de aproximadamente el 20 % de precursores químicos o de proteínas no pertenecientes a la presente divulgación, aún más preferentemente menos de aproximadamente el 10 % de precursores químicos o de proteínas no pertenecientes a la presente divulgación, y mucho más preferentemente menos de aproximadamente el 5 % de precursores químicos o de proteínas no pertenecientes a la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, una "porción biológicamente activa" de uno o más polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7) incluye polipéptidos que participan en una interacción entre PD-1 y una molécula distinta de PD-1, PD-L1 y una molécula distinta de PD-L1, o PD-L2 y una molécula distinta de PD-L2, por ejemplo, un ligando natural de PD-1, por ejemplo, ligandos de PD-1, o un ligando natural de ligandos de PD-1, por ejemplo, PD-1 o B7-1, respectivamente. Las porciones biológicamente activas de uno o más polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7) incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas o derivadas de la secuencia de aminoácidos del uno o más polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), que incluyen menos aminoácidos que los respectivos polipéptidos de longitud completa de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7), y exhiben al menos una actividad del uno o más respectivos polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, los de las figuras 2-7). En una realización, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con la capacidad de unirse específicamente a PD-1 o un ligando de PD-L1 de acuerdo con el antígeno, respectivamente, para el que se generó o se diseñó para unirse. Las porciones biológicamente activas del uno o más polipéptidos de la presente divulgación (por ejemplo, las de las figuras 2-7) se pueden usar como dianas para desarrollar agentes que modulen una actividad mediada por PD-1, PD-L1 o PD-L2, por ejemplo, activación o supresión de células inmunitarias.

En otros aspectos de la presente divulgación, el polipéptido es sustancialmente idéntico al uno o más polipéptidos mostrados en las figuras 2-7, y conserva la actividad funcional del uno o más polipéptidos respectivos mostrados en las figuras 2-7, pero difiere en secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis, como se describe en detalle en la subsección I anterior. Por consiguiente, también se describe en el presente documento un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 71 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o un 99,9 % o más idéntica a uno o más polipéptidos mostrados en las figuras 2-7.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines comparativos óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para una alineación óptima, y las secuencias no idénticas se pueden descartar con fines comparativos). En un aspecto de la divulgación, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 %, más preferentemente al menos un 50 %, incluso más preferentemente al menos un 60 %, e incluso más preferentemente al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o un 99,9 % de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación, se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias depende del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se requiere introducir para una alineación óptima de las dos secuencias.

La invención también proporciona proteínas quiméricas o de fusión. Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" comprende uno o más polipéptidos de la presente invención como se define en las reivindicaciones unidos operativamente a un polipéptido no perteneciente a la presente invención. "Uno o más

polipéptidos de la presente invención" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido mostrado en las figuras 4-5 (SEQ ID No: 34-42), mientras que un "polipéptido no perteneciente a la presente invención" se refiere a un polipéptido que no tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido que no es sustancialmente homólogo a un polipéptido mostrado en las figuras 2-7, por ejemplo, un polipéptido que es diferente de un polipéptido mostrado en las figuras 2-7 y que se obtiene del mismo organismo o uno diferente. Dentro de la proteína de fusión, la expresión "unido operativamente" pretende indicar que el uno o más polipéptidos de la presente invención y el uno o más polipéptidos no pertenecientes a la presente invención están fusionados en marco entre sí. El uno o más polipéptidos no pertenecientes a la presente invención se pueden fusionar al extremo N o al extremo C del uno o más polipéptidos de la presente invención y corresponden a un resto que altera la solubilidad, la afinidad de unión, la estabilidad o la valencia del uno o más polipéptidos de la presente invención.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión GST con uno o más polipéptidos de la presente invención. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de polipéptidos recombinantes de la invención. En otra realización, la proteína de fusión contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. En determinadas células hospedadoras (por ejemplo, células hospedadoras de mamífero), la expresión y/o secreción de uno o más polipéptidos de la presente invención se pueden aumentar mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.

Se pueden producir uno o más polipéptidos quiméricos o de fusión de la presente invención mediante técnicas de ADN recombinante estándar. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se ligan entre sí en marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos romos o escalonados para la ligadura, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable y ligadura enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automatizados de ADN. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos génicos se puede realizar usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente se pueden hibridar y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons: 1992). Además, hay muchos vectores de expresión disponibles comercialmente que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST).

Las secuencias de aminoácidos de uno o más polipéptidos de la presente invención como se definen en las reivindicaciones (es decir, las de las figuras 4-5) identificadas en el presente documento permitirán a los expertos en la técnica producir polipéptidos correspondientes a uno o más polipéptidos de la presente invención (es decir, los de las figuras 4-5). Dichos polipéptidos se pueden producir en células hospedadoras procarióticas o eucariotas mediante la expresión de polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos de la presente invención (es decir, los de las figuras 4-5). Como alternativa, dichos péptidos se pueden sintetizar mediante métodos químicos. Los métodos para la expresión de polipéptidos heterólogos en hospedadores recombinantes, la síntesis química de polipéptidos y la traducción *in vitro* se conocen bien en la técnica y se describen con más detalle en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 2.^a Ed., Cold Spring Harbor, N. Y.; Berger y Kimmel, Methods in Enzymology, volumen 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91:501; Chaiken I. M. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 11:255; Kaiser *et al.* (1989) Science 243:187; Merrifield, B. (1986) Science 232:342; Kent, S. B. H. (1988) Annu. Rev. Biochem. 57:957; y Offord, R. E. (1980) Semisynthetic Proteins, Wiley Publishing).

III. Anticuerpos contra PD-1, PD-L 1 y/o PD-L2

Anticuerpos contra PD-1, PD-L1 o PD-L2 descritos en el presente documento pueden producirse usando cualquier método descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos humanos) de la invención se pueden producir usando una diversidad de técnicas conocidas, tales como la técnica de hibridación de células somáticas estándar descrita por Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, también se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B, técnica de presentación en fagos usando genotecas de anticuerpos humanos.

Un método para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de la invención es el sistema murino. La producción de hibridomas en ratones se conoce bien en la técnica, incluyendo protocolos y técnicas de inmunización para aislar y fusionar esplenocitos inmunizados.

Los anticuerpos policlonales se pueden preparar como se ha descrito anteriormente inmunizando a un sujeto adecuado con un inmunógeno polipeptídico. El valor de anticuerpos polipeptídicos en el sujeto inmunizado se puede controlar a lo largo del tiempo mediante técnicas convencionales, tales como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando un polipéptido inmovilizado. Si se desea, el anticuerpo dirigido contra el antígeno se puede aislar de los mamíferos (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente por técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de proteína A para obtener la fracción de IgG. En un momento adecuado después de la

inmunización, por ejemplo, cuando los valores de anticuerpos son más altos, las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse del sujeto y usarse para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497 (véanse también Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:2927-31; y Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75), la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos más reciente (Kozbor *et al.* (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica del hibridoma del VEB (Cole *et al.* (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96) o técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas de anticuerpos monoclonales se conoce bien (véase generalmente Kenneth, R. H. in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., Nueva York, Nueva York (1980); Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54:387-402; Getter, M. L. *et al.* (1977) *Somatic Cell Genet.* 3:231-36). Brevemente, se fusiona una línea celular inmortal (típicamente un mieloma) a linfocitos (típicamente esplenocitos) de un mamífero inmunizado con un inmunógeno como se ha descrito anteriormente, y los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma resultantes se criban para identificar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal que se une al antígeno polipeptídico, preferentemente, de manera específica.

Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos usados para fusionar linfocitos y líneas celulares inmortalizadas se puede aplicar con el fin de generar un anticuerpo monoclonal anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 (véanse, por ejemplo, Galfre, G. *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Geffer *et al.* (1977) anteriormente; Lerner (1981) anteriormente; Kenneth (1980) anteriormente. Además, el trabajador cualificado apreciará que existen muchas variaciones de tales métodos que también serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) procede de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Por ejemplo, se pueden preparar hibridomas murinos fusionando linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón inmortalizada. Las líneas celulares inmortales preferidas son líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles al medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"). Puede usarse cualquiera de varias líneas celulares de mieloma como compañero de fusión de acuerdo con técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), Rockville, Md. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón usando polietilenglicol ("PEG"). A continuación, las células de hibridoma resultantes de la fusión se seleccionan usando medio HAT, que destruye las células de mieloma no fusionadas y fusionadas de manera improductiva (los esplenocitos no fusionados mueren después de varios días porque no se transforman). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan cribando los sobrenadantes del cultivo de hibridoma en busca de anticuerpos que se unan a un polipéptido determinado, por ejemplo, usando un ensayo ELISA estándar.

Como alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un monoclonal específico para uno de los polipéptidos descritos anteriormente mediante el cribado de una biblioteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos) con el polipéptido apropiado para aislar de este modo miembros de la biblioteca de inmunoglobulinas que se unen al polipéptido. Los kits para generar y cribar bibliotecas de presentación en fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el *Recombinant Phage Antibody System* de Pharmacia, N.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de presentación en fagos *SurfZAP™* de Stratagene, N.º de catálogo 240612). Además, se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para su uso en la generación y cribado de una biblioteca de presentación de anticuerpos en, por ejemplo, Ladner *et al.* Patente de EE. UU. N.º 5.223.409; Kang *et al.* Publicación Internacional N.º WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación Internacional N.º WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación Internacional WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación Internacional N.º WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación Internacional WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación Internacional N.º WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación Internacional N.º WO 92/09690; Ladner *et al.* Publicación Internacional N.º WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Biotechnology* (NY) 9:1369-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrard *et al.* (1991) *Biotechnology* (NY) 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; y McCafferty *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554.

Además, se pueden generar anticuerpos anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos, compuestos y humanizados, que se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante estándar. Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos, compuestos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, usando los métodos descritos en Robinson *et al.* Publicación de Patente Internacional WO 87/002671; Akira *et al.* Solicitud de Patente Europea 184.187; Taniguchi, M. Solicitud de Patente Europea 171.496; Morrison *et al.* Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger *et al.* Solicitud PCT WO 86/01533; Cabilly *et al.* Patente de EE. UU. N.º 4.816.567; Cabilly *et al.* Solicitud de Patente Europea 125.023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; y Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Biotechniques* 4:214; Winter Patente de EE. UU. 5.225.539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Además, los anticuerpos humanizados se pueden preparar de acuerdo con protocolos estándar tales como los divulgados en la Patente de EE. UU. 5.565.332. En otra realización, se pueden producir cadenas de anticuerpos o miembros de un par de unión específica mediante recombinación entre vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican una fusión de una cadena polipeptídica de un miembro de un par de unión específica y un componente de un paquete de presentación genérico replicable y vectores que contienen moléculas de ácido nucleico que codifican una segunda cadena polipeptídica de un único miembro del par de unión usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, como se describe en las Patentes de EE. UU. 5.565.332, 5.871.907 o 5.733.743. El uso de anticuerpos intracelulares para inhibir la función de proteínas en una célula también se conoce en la técnica (véanse, Carlson, J. R. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2638-2646; Biocca, S. *et al.* (1990) *EMBO J.* 9:101-108; Werge, T. M. *et al.* (1990) *FEBS Lett.* 274:193-198; Carlson, J. R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7427-7428; Marasco, W. A. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893; Biocca, S. *et al.* (1994) *Biotechnology (NY)* 12:396-399; Chen, S-Y. *et al.* (1994) *Hum. Gene Ther.* 5:595-601; Duan, L. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5075-5079; Chen, S-Y. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5932-5936; Beerli, R. R. *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:23931-23936; Beerli, R. R. *et al.* (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204:666-672; Mhashilkar, A. M. *et al.* (1995) *EMBO J.* 14:1542-1551; Richardson, J. H. *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3137-3141; Publicación PCT N.º WO 94/02610 de Marasco *et al.*; y Publicación PCT N.º WO 95/03832 de Duan *et al.*).

En otra realización, se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra PD-1, PD-L1 o PD-L2 usando ratones transgénicos o trans cromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. En una realización, ratones transgénicos, denominados en el presente documento "ratones HuMAb" que contienen un minilocus del gen de la inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y pesada humana (μ e γ) no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus de cadena μ y κ endógenos (Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856 859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos se someten a intercambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales de IgGk humana de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), anteriormente; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49 101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65 93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536 546). La preparación de ratones HuMAb se describe en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287 6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647 656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720 3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117 123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821 830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912 2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856 859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49 101; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579 591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65 93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536 546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845 851. Véanse además, las Pat. de EE. UU. N.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas de Lonberg y Kay, y GenPharm International; Pat. de EE. UU. N.º 5.545.807 de Surani *et al.*; Publicaciones Internacionales N.º WO 98/24884, publicada el 11 de junio de 1998; WO 94/25585, publicada el 10 de noviembre de 1994; WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22645, publicada el 23 de diciembre de 1992; WO 92/03918, publicada el 19 de marzo de 1992.

En otra realización, un anticuerpo para su uso en la invención es un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico tiene sitios de unión para dos antígenos diferentes dentro de un único polipéptido de anticuerpo. La unión al antígeno puede ser simultánea o secuencial. Los triomas y los hibridomas híbridos son dos ejemplos de líneas celulares que pueden secretar anticuerpos biespecíficos. Se describen ejemplos de anticuerpos biespecíficos producidos por un hibridoma híbrido o un trioma en la Pat. de EE. UU. 4.474.893. Se han construido anticuerpos biespecíficos por medios químicos (Staerz *et al.* (1985) *Nature* 314:628, y Perez *et al.* (1985) *Nature* 316:354) y tecnología de hibridoma (Staerz y Bevan (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:1453, y Staerz y Bevan (1986) *Immunol. Today* 7:241). Los anticuerpos biespecíficos también se describen en la Patente de EE. UU. 5.959.084. En la Patente de EE. UU. 5.798.229 se describen fragmentos de anticuerpos biespecíficos. También se pueden generar agentes biespecíficos elaborando heterohibridomas mediante la fusión de hibridomas u otras células que producen anticuerpos diferentes, seguida de la identificación de clones que producen y ensamblan conjuntamente ambos anticuerpos. También se pueden generar mediante conjugación química o genética de cadenas de inmunoglobulina completas o porciones de las mismas, tales como secuencias Fab y Fv. El componente de anticuerpo puede unirse a PD-L1. En una realización, el anticuerpo biespecífico podría unirse específicamente tanto a un ligando de PD-1 como a un polipéptido PD-1.

Otro aspecto más de la divulgación se refiere a anticuerpos polipeptídicos anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 que se pueden obtener mediante un proceso que comprende inmunizar un animal con un polipéptido PD-1, PD-L1 o PD-L2 inmunogénico, respectivamente, o una porción inmunogénica del mismo; y a continuación aislar del animal los anticuerpos que se unan específicamente al polipéptido.

En otro aspecto más de la invención, se pueden usar secuencias de anticuerpos parciales o conocidas para generar y/o expresar nuevos anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácidos que están ubicados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre

anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo de origen natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, 1998, Nature 332:323 327; Jones, P. *et al.*, 1986, Nature 321:522 525; y Queen, C. *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 86:10029 10033). Dichas secuencias marco se pueden obtener de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal o de línea no germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias génicas de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante la unión de V(D)J durante la maduración de los linfocitos B. Las secuencias génicas de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en el individuo de manera uniforme en la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción del extremo amino de la región marco. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción del extremo amino de la región marco 1 y en la porción del extremo carboxi de la región marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por este motivo, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/045962, publicado el 16 de septiembre de 1999). Para este fin suele ser suficiente una secuencia parcial de cadenas pesada y ligera que abarca las regiones CDR. La secuencia parcial se usa para determinar qué segmentos génicos variables y de unión de línea germinal y/o de línea no germinal contribuyeron a los genes variables de anticuerpos recombinados. A continuación, la secuencia de línea germinal y/o de línea no germinal se usa para completar las porciones que faltan de las regiones variables. Las secuencias líderes de cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de proteínas y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias faltantes, las secuencias de ADNc clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligadura o amplificación por PCR. Como alternativa, toda la región variable se puede sintetizar como un conjunto de oligonucleótidos cortos y superpuestos y se puede combinar mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene determinadas ventajas, tales como eliminación o inclusión de sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares. El proceso también se puede usar para cribar bibliotecas de secuencias codificantes de inmunoglobulinas particulares en una especie (por ejemplo, ser humano) para diseñar secuencias codificantes de inmunoglobulinas afines a partir de secuencias de anticuerpos conocidas en otra especie (por ejemplo, ratón) (véase, por ejemplo, la sección de Ejemplos a continuación).

Las secuencias de nucleótidos de los transcritos de cadena pesada y ligera de un hibridoma se usan para diseñar un conjunto superpuesto de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de las cadenas pesada y kappa pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: las cadenas de bases de nucleótidos repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; los sitios óptimos de inicio de la traducción se incorporan de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870); y, los sitios HindIII se diseñan cadena arriba de los sitios de inicio de la traducción.

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como de ligera, las secuencias de cadena codificantes optimizadas y no codificantes correspondientes se descomponen en 30-50 nucleótidos, aproximadamente el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos bicatenarios superpuestos que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. A continuación, los grupos se usan como plantillas para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Típicamente, un único conjunto de oligonucleótidos de región variable se descompondrá en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR superpuestos. A continuación, estos productos superpuestos se combinan mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento superpuesto de la región constante de cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en las construcciones del vector de expresión.

A continuación, las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan con el promotor clonado, secuencia líder, inicio de la traducción, secuencia líder, región constante, 3' no traducida, poliadenilación y terminación de la transcripción, secuencias para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células hospedadoras que, a continuación, se fusionan para formar una célula hospedadora que expresa ambas cadenas.

Los plásmidos para este uso son conocidos en la técnica e incluyen los plásmidos proporcionados en la sección de Ejemplos a continuación. Los anticuerpos completamente humanos y quiméricos de la presente invención también incluyen anticuerpos IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM e IgD. Se pueden construir plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

Por lo tanto, en otro aspecto de la divulgación, las características estructurales de anticuerpos humanos o no humanos conocidos (por ejemplo, un anticuerpo anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 anti humano de ratón, tales como los anticuerpos EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12, respectivamente) se usan para crear anticuerpos humanos anti PD-1, PD-L1 o PD-

L2 humanos estructuralmente relacionados que conservan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a PD-1, PD-L1 o PD-L2. Otra propiedad funcional incluye la inhibición de la unión de EH12.2H7 a PD-1, 29E.2A3 a PD-L1 o 24F.10C12 a PD-L2 en un ensayo ELISA competitivo. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos estructuralmente relacionados tienen una menor afinidad de unión al antígeno en comparación con el anticuerpo EH12.2H7, 29E.2A3 o 24F.10C12 según lo medido por el valor de CI_{50} como se describe en el Ejemplo 2 (por ejemplo, la afinidad del anticuerpo murino de referencia no es más de 3,0, 2,0, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2 o 1,1 veces la del anticuerpo estructuralmente relacionado anticuerpo). En algunas realizaciones, los anticuerpos anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos estructuralmente relacionados tienen una mayor afinidad por el antígeno en comparación con el anticuerpo EH12.2H7, 29E.2A3 o 24F.10C12 según lo medido mediante el valor de CI_{50} como se describe en el Ejemplo 2 (tal como la afinidad del anticuerpo estructuralmente relacionado es al menos 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2,0 veces la del anticuerpo de referencia). Además, una o más CDR o regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7) se pueden combinar de manera recombinante con regiones marco humanas y CDR conocidas para crear anticuerpos anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos genomanipulados de manera recombinante adicionales de la invención.

Dado que se conoce bien en la técnica que los dominios CDR3 de cadena pesada y ligera de anticuerpo desempeñan una función particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, los anticuerpos recombinantes de la invención preparados como se ha expuesto anteriormente comprenden preferentemente las CDR3 de cadena pesada y ligera de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7). Los anticuerpos pueden comprender además las CDR2 de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7). Los anticuerpos pueden comprender además las CDR1 de regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7). Los anticuerpos pueden comprender además cualquier combinación de las CDR.

Las regiones CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos genomanipulados descritos anteriormente pueden comprender la una o más secuencias de aminoácidos exactas como las de las regiones variables de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7) divulgadas en el presente documento. Sin embargo, el experto habitual en la técnica apreciará que puede ser posible alguna desviación de las secuencias CDR exactas manteniendo al mismo tiempo la capacidad del anticuerpo para unirse eficazmente a PD-1, PD-L1 o PD-L2 (por ejemplo, modificaciones de secuencia conservadoras). Por consiguiente, en otra realización, el anticuerpo genomanipulado puede estar compuesto por una o más CDR que son, por ejemplo, un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 99,5 % idénticas a una o más CDR de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7).

Además de simplemente unirse a PD-1, PD-L1 o PD-L2, pueden seleccionarse anticuerpos genomanipulados tales como los descritos anteriormente por su retención de otras propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención, tales como:

(1) unión a PD-1, PD-L1 o PD-L2 humana;

(2) inhibición de la unión de EH12.2H7 a PD-1, 29E.2A3 a PD-L1 o 24F.10C12 a PD-L2;

(3) unión a PD-1 humana e inhibición de la capacidad de la PD-1 unida para unirse a ligandos de PD-1 (por ejemplo, PD-L1 y/o PD-L2);

(4) unión a PD-L1 humana e inhibición de la capacidad de la PD-L1 unida para unirse a ligandos de PD-L1 (por ejemplo, PD-1 y/o B7-1);

(5) unión a PD-L2 humana e inhibición de la capacidad de la PD-L2 unida para unirse a ligandos de PD-L2 (por ejemplo, PD-1).

A continuación se muestran las secuencias de aminoácidos de región variable de cadenas pesada y ligera para el anticuerpo EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12.

Región variable de cadena pesada de EH12.2H7

QVQLQQSGAELAKPGASVQMCKASGYSTSSWIHWVKQRPQGQGLEWIGYIYPSTGFT
EYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQG
TSVTYSS (SEQ ID NO:76)

Región variable de cadena ligera de EH12.2H7

DIVLTQSPASLTIVSLGQRATISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKFGSNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:77)

Región variable de cadena pesada de 29E.2A3

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFDNG
TKYNEMFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGTILVTVS
A (SEQ ID NO:78)

5

Región variable de cadena ligera de 29E.2A3

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS
GVPARFSGSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRVPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:79)

10

Región variable de cadena pesada de 24F.10C12

QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPRSGY
TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARPWFAYWGQGTILVTVSA
(SEQ ID NO:80)

15

Región variable de cadena ligera de 24F.10C12

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK (SEQ
ID NO:81)

La actividad de los anticuerpos para inhibir la unión de PD-1, PD-L1 o PD-L2 a su ligando o ligandos se puede determinar ensayando la capacidad del anticuerpo para bloquear la unión entre PD-1, PD-L1 o PD-L2 y su ligando.

20

Puede usarse un ensayo ELISA competitivo en presencia de un ligando marcado y el anticuerpo. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo anti PD-L1 podría bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1, se realiza un experimento de unión competitiva. Las células que expresan PD-L1 se incuban previamente con el anticuerpo anti PD-L1 seguido de la adición de la proteína de fusión PD-1-Ig biotinilada. Si el anticuerpo anti PD-L1 bloquea la unión de PD-1-Ig de una forma dependiente de la dosis y con gran avidez, se considera que el anticuerpo anti PD-L1 es eficaz para inhibir la interacción entre PD-1 y PD-L1. Se pueden realizar pruebas similares para ensayar anticuerpos que sean eficaces para inhibir la interacción de PD-1 y PD-L2.

25

IV. Vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras

30

Otro aspecto de la divulgación se refiere a vectores, preferentemente vectores de expresión, que contienen una, dos o más moléculas de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7) (o una porción de los mismos). Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales.

35

Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son aptos para la replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y, de este modo, se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. En el presente documento dichos vectores se denominan "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, se pretende que la divulgación incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

45

Los vectores de expresión recombinantes de la presente divulgación comprenden un ácido nucleico de la divulgación en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células hospedadoras que se van a usar para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido

50

nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la una o más secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185:3-7. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada y similares. Los vectores de expresión de la presente divulgación se pueden introducir en células hospedadoras para producir de este modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en el presente documento.

Los vectores de expresión recombinantes de la presente divulgación se pueden diseñar para determinar la expresión de polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7) en células procarióticas o eucariotas. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamífero. Las células hospedadoras adecuadas se analizan con más detalle en Goeddel (1990) anteriormente. Como alternativa, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

La expresión de polipéptidos en procariotas se realiza con mayor frecuencia en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden una cantidad de aminoácidos a un polipéptido codificado en los mismos, por lo general al extremo amino o carboxilo del polipéptido recombinante. Dichos vectores de fusión típicamente sirven para tres fines: 1) aumentar la expresión del polipéptido recombinante; 2) aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y 3) facilitar la purificación del polipéptido recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. Con frecuencia, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E o proteína A, respectivamente, al polipéptido recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* sin fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amann *et al.* (1988) *Gene* 69:301-315) y pET 11d (Studier *et al.* (1990) *Methods Enzymol.* 185:60-89). La expresión de genes diana a partir del vector pTrc se basa en la transcripción de la ARN polimerasa del hospedador a partir de un promotor de fusión híbrida de *trp-lac*. La expresión génica diana a partir del vector pET 11d se basa en la transcripción de un promotor de fusión de T7 *gn10-lac* mediada por una ARN polimerasa vírica expresada conjuntamente (T7 *gn1*). Esta polimerasa vírica es suministrada por cepas hospedadoras, BL21(DE3) o HMS174(DE3), de un profago residente que alberga un gen T7 *gn1* bajo el control transcripcional del promotor *lacUV 5*.

Una estrategia para maximizar la expresión del polipéptido recombinante en *E. coli* es expresar el polipéptido en bacterias hospedadoras con capacidad deteriorada para escindir proteolíticamente el polipéptido recombinante (Gottesman, S. (1990) *Methods Enzymol.* 185:119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que se va a insertar en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada *et al.* (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Dicha alteración de secuencias de ácidos nucleicos de la presente divulgación se puede realizar mediante técnicas de síntesis de ADN estándar.

En otro aspecto de la presente divulgación, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.* (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Como alternativa, los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7) se pueden expresar en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de polipéptidos en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen la serie pAc' (Smith *et al.* (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

En otro aspecto más de la presente divulgación, un ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, figuras 2-7) se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) y pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) *EMBO J.* 6:187-195). Cuando se usan en células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión se

proporcionan frecuentemente por elementos reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente proceden de poliovirus, adenovirus 2, citomegalovirus y virus del simio 40. Para conocer otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procarióticas como eucariotas, véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

En otro aspecto de la presente divulgación, el vector de expresión de mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Se conocen en la técnica elementos reguladores específicos de tejido. Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert *et al.* (1987) Genes Dev. 1:268-277), promotores específicos linfoides (Calame y Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), promotores particulares de receptores de linfocitos T (Winoto y Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) e inmunoglobulinas (Banerji *et al.* (1983) Cell 33:729-740; Queen y Baltimore (1983) Cell 33:741-748), promotores específicos de neuronas (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos; Byrne y Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund *et al.* (1985) Science 230:912-916), y promotores específicos de la glándula mamaria (por ejemplo, promotor del suero de leche; Pat. de EE. UU. N.º 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea N.º 264.166). También se incluyen promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo, por los promotores *hox* murinos (Kessel y Gruss (1990) Science 249:374-379) y el promotor de alfa-fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

Otro aspecto de la divulgación se refiere a células hospedadoras en las que se introduce una molécula de ácido nucleico de la presente divulgación (por ejemplo, figuras 2-7) dentro de un vector de expresión recombinante o una molécula de ácido nucleico que contiene secuencias que le permiten recombinarse de manera homóloga en un sitio específico del genoma de la célula hospedadora. Las expresiones "célula hospedadora" y "célula hospedadora recombinante" se usan indistintamente en el presente documento. Se entiende que tales términos se refieren no sólo a la célula en cuestión particular sino a la descendencia o descendencia potencial de tal célula. Dado que en generaciones sucesivas pueden producirse algunas modificaciones debido a mutaciones o a influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, ser idéntica a la célula original, pero sigue estando incluida en el alcance de la expresión tal como se usa en el presente documento.

Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7) se puede expresar en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levaduras o mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células hospedadoras adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usan en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una diversidad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico exógeno (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable en células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usada, solo una pequeña fracción de las células puede integrar el ADN exógeno en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen los que confieren farmacoresistencia, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable se puede introducir en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica un polipéptido PD-L2 o se puede introducir en un vector separado. Las células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido se pueden identificar mediante selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Una célula hospedadora de la divulgación, tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, se puede usar para producir (es decir, expresar) un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7). Por consiguiente, la divulgación proporciona además métodos para producir un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7) usando las células hospedadoras de la presente divulgación. En un aspecto de la presente divulgación, el método comprende cultivar la célula hospedadora de la divulgación (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7)) en un medio adecuado de tal forma que se produce un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7). En otro aspecto de la presente divulgación, el método comprende además aislar un polipéptido de la presente invención (por ejemplo, figuras 2-7) del medio o de la célula hospedadora.

Las células hospedadoras descritas en el presente documento también se pueden usar para producir animales transgénicos no humanos, como se describe a continuación.

V. Producción de animales no humanos transgénicos y transcromosómicos que generan anticuerpos contra PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos compuestos

En otro aspecto más, la divulgación proporciona animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, tales como ratones transgénicos o transcromosómicos, que son capaces de expresar anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-1, PD-L1 o PD-L2. En un aspecto particular, la divulgación proporciona un ratón transgénico o transcromosómico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana, de modo que el ratón produce anticuerpos anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos cuando se inmuniza con antígeno PD-1, PD-L1 o PD-L2 y/o células que expresan PD-1, PD-L1 o PD-L2. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, HuMAb, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el transgén de cadena pesada humana se puede mantener extracromosómicamente, como es el caso de los ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1, PD-L1 o PD-L2 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sometidos a recombinación de V-D-J e intercambio de isotipo. El intercambio de isotipo puede tener lugar, por ejemplo, mediante intercambio de isotipo clásico o no clásico.

El diseño de un animal no humano transgénico o transcromosómico que responde a la estimulación de antígeno exógeno con un repertorio de anticuerpos heterólogos requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos contenidos dentro del animal transgénico funcionen correctamente a lo largo de la vía de desarrollo de linfocitos B. Esto incluye, por ejemplo, el intercambio de isotipo del transgén de cadena pesada heterólogo. Por consiguiente, los transgenes se construyen para producir intercambio de isotipo y uno o más de los siguientes anticuerpos: (1) expresión de alto nivel y específica del tipo celular, (2) reordenamiento genético funcional, (3) activación de y respuesta a la exclusión alélica, (4) expresión de un repertorio primario suficiente, (5) transducción de señales, (6) hipermutación somática y (7) dominio del locus del anticuerpo del transgén durante la respuesta inmunitaria.

No es necesario cumplir todos los criterios anteriores. Por ejemplo, en aquellos aspectos en donde los locus de inmunoglobulina endógena del animal transgénico están funcionalmente alterados, no es necesario que el transgén active la exclusión alélica. Además, en aquellos aspectos en donde el transgén comprende un gen de inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera funcionalmente reordenado, el segundo criterio de reordenamiento funcional del gen es innecesario, al menos para ese transgén que ya está reordenado. Para conocer los antecedentes sobre inmunología molecular, véase, *Fundamental Immunology*, 2.^a edición (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.

En determinados aspectos de la presente divulgación, los animales no humanos transgénicos o transcromosómicos usados para generar los anticuerpos monoclonales humanos de la invención contienen transgenes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina heterólogos reordenados y no reordenados o una combinación de los mismos en la línea germinal del animal transgénico. Cada uno de los transgenes de cadena pesada comprende al menos un gen CH. Además, el transgén de cadena pesada puede contener secuencias de intercambio de isotipo funcionales, que son capaces de soportar el intercambio de isotipo de un transgén heterólogo que codifica múltiples genes CH en los linfocitos B del animal transgénico. Dichas secuencias de cambio pueden ser aquellas que se producen de manera natural en el locus de inmunoglobulina de línea germinal de la especie que sirve como fuente de los genes CH del transgén, o dichas secuencias de intercambio pueden proceder de aquellas que tienen lugar en la especie que va a recibir la construcción del transgén (el animal transgénico). Por ejemplo, una construcción transgénica humana que se usa para producir un ratón transgénico puede producir una mayor frecuencia de eventos de intercambio de isotipo si incorpora secuencias de intercambio similares a las que tienen lugar de manera natural en el locus de cadena pesada del ratón, ya que, presumiblemente, las secuencias de intercambio de ratón están optimizadas para funcionar con el sistema enzimático recombinasa de intercambio de ratón, mientras que las secuencias de intercambio humanas no. Las secuencias de intercambio pueden aislarse y clonarse mediante métodos de clonación convencionales, o pueden sintetizarse *de novo* a partir de oligonucleótidos sintéticos superpuestos diseñados sobre la base de información de secuencia publicada relacionada con secuencias de regiones de intercambio de inmunoglobulina (Mills *et al.*, Nucl. Acids Res. 15:7305 7316 (1991); Sideras *et al.*, Intl. Immunol. 1:631 642 (1989)). Para cada uno de los animales transgénicos anteriores, se encuentran transgenes de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada heterólogos funcionalmente reordenados en una fracción significativa de los linfocitos B del animal transgénico (al menos el 10 por ciento).

Los transgenes usados para generar los animales transgénicos de la presente divulgación incluyen un transgén de cadena pesada que comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. El transgén de cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de cadena ligera y pesada son heterólogos para el animal no humano transgénico en el sentido de que proceden, o corresponden a, ADN que codifica segmentos génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal no humano transgénico. En un aspecto de la divulgación, el transgén se

construye de manera que los segmentos génicos individuales no estén reordenados, es decir, no reordenados para codificar una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina funcional. Dichos transgenes no reordenados apoyan la recombinación de los segmentos génicos V, D y J (reordenamiento funcional) y preferentemente soportan la incorporación de todo o una parte de un segmento génico de la región D en la cadena pesada de inmunoglobulina reordenada resultante en el animal no humano transgénico cuando se expone al antígeno PD-1, PD-L1 o PD-L2.

En un aspecto alternativo de la presente divulgación, los transgenes comprenden un "minilocus" no reordenado. Dichos transgenes típicamente comprenden una porción sustancial de los segmentos C, D y J, así como un subconjunto de los segmentos génicos V. En dichas construcciones transgénicas, las diversas secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de intercambio de clase, secuencias donadoras y aceptoras de corte y empalme para el procesamiento de ARN, señales de recombinación y similares, comprenden secuencias correspondientes procedentes del ADN heterólogo. Dichas secuencias reguladoras pueden incorporarse al transgén de la misma especie o de una especie relacionada del animal no humano divulgado en el presente documento. Por ejemplo, pueden combinarse segmentos génicos de inmunoglobulina humana en un transgén con una secuencia potenciadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico. Como alternativa, pueden incorporarse secuencias reguladoras sintéticas en el transgén, en donde dichas secuencias reguladoras sintéticas no son homólogas a una secuencia de ADN funcional que se sabe que se produce de manera natural en el genoma de los mamíferos. Las secuencias reguladoras sintéticas están diseñadas de acuerdo con reglas de consenso, tales como, por ejemplo, aquellas que especifican las secuencias permitidas de un sitio aceptor de corte y empalme o un motivo promotor/potenciador. Por ejemplo, un minilocus comprende una porción del locus de inmunoglobulina genómica que tiene al menos una delección interna (es decir, no en un extremo de la porción) de una porción de ADN no esencial (por ejemplo, secuencia intermedia; intrón o porción de la misma) en comparación con el locus de Ig de línea germinal de origen natural.

Los ratones transgénicos y transcromosómicos empleados en la presente divulgación pueden exhibir producción de inmunoglobulinas con un repertorio significativo, idealmente sustancialmente similar al de un ratón natural. Por lo tanto, por ejemplo, en aspectos de la divulgación donde los genes endógenos de Ig se han inactivado, los niveles totales de inmunoglobulina pueden variar de aproximadamente 0,1 a 10 mg/ml de suero, o de aproximadamente 0,5 a 5 mg/ml, o al menos aproximadamente 1,0 mg/ml. Cuando se ha introducido en el ratón transgénico un transgén capaz de efectuar un intercambio de IgG a IgM, la relación de IgG sérica con respecto a IgM en un ratón adulto puede ser de aproximadamente 10:1. La relación de IgG con respecto a IgM será mucho menor en el ratón inmaduro. En general, más de aproximadamente el 10 %, preferentemente del 40 % al 80 % de los linfocitos B del bazo y de los ganglios linfáticos expresan exclusivamente proteína IgG humana.

Lo ideal sería que el repertorio se aproximara al mostrado en un ratón natural, normalmente al menos aproximadamente el 10 % o del 25 % al 50 % o más. Generalmente, se producirán al menos aproximadamente mil inmunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), por ejemplo, preferentemente de 10^4 a 10^6 o más, dependiendo principalmente del número de regiones V, J y D diferentes introducidas en el genoma de ratón. Estas inmunoglobulinas típicamente reconocerán aproximadamente la mitad o más de proteínas muy antigénicas, por ejemplo, proteína A de estafilococo. Típicamente, las inmunoglobulinas exhibirán una afinidad (K_D) por antígenos preseleccionados inferior a 10^{-7} M, tal como inferior a 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M o incluso inferior.

En algunos aspectos de la presente divulgación, puede ser preferible generar ratones con repertorios predeterminados para limitar la selección de genes V representados en la respuesta de anticuerpos a un tipo de antígeno predeterminado. Un transgén de cadena pesada que tiene un repertorio predeterminado puede comprender, por ejemplo, genes V_H humanos que se usan preferentemente en respuestas de anticuerpos al tipo de antígeno predeterminado en seres humanos. Como alternativa, algunos genes V_H pueden excluirse de un repertorio definido por diversas razones (por ejemplo, tienen una baja probabilidad de codificar regiones V de alta afinidad para el antígeno predeterminado; tienen una baja propensión a sufrir mutaciones somáticas y agudización de la afinidad; o son inmunogénicos para determinados humanos). Por lo tanto, antes del reordenamiento de un transgén que contiene diversos segmentos génicos de cadena pesada o ligera, dichos segmentos génicos pueden identificarse fácilmente, por ejemplo, mediante hibridación o secuenciación de ADN, como procedentes de una especie de organismo distinta del animal transgénico.

Los ratones transgénicos y transcromosómicos como se han descrito anteriormente pueden inmunizarse con, por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida de antígeno PD-1, PD-L1 o PD-L2 y/o células que expresan PD-1, PD-L1 o PD-L2. Como alternativa, los ratones transgénicos se pueden inmunizar con ADN que codifica PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanas. A continuación, los ratones producirán linfocitos B que se someten a un intercambio de clase mediante recombinación de intercambio intratransgén (intercambio cis) y expresan inmunoglobulinas reactivas con PD-1, PD-L1 o PD-L2. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos humanos (también denominados "anticuerpos de secuencia humana"), en donde los polipéptidos de cadena pesada y ligera están codificados por secuencias transgénicas humanas, que pueden incluir secuencias procedentes de mutación somática y uniones recombinatorias de la región V, así como secuencias codificadas por la línea germinal; se puede hacer referencia a que estos anticuerpos humanos son sustancialmente idénticos a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico VL o VH humano y un segmento JL o DH y JH humano, incluso aunque otras secuencias de línea no germinal puedan estar presentes como resultado de una mutación somática y uniones de recombinación V-J y V-D-J diferenciales. Las

regiones variables de cada cadena de anticuerpo típicamente están codificadas en al menos un 80 por ciento por segmentos génicos V, J y, en el caso de cadenas pesadas, D, de línea germinal humana; frecuentemente al menos el 85 por ciento de las regiones variables están codificadas por secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén; a menudo el 90 o el 95 por ciento o más de las secuencias de región variable están codificadas por secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, dado que las secuencias de línea no germinal se introducen mediante mutación somática y unión VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humanos frecuentemente tendrán algunas secuencias de región variable (y con menos frecuencia secuencias de región constante) que no están codificadas por segmentos génicos V, D o J humanos, tal como se encuentran en el uno o más transgenes humanos en la línea germinal de los ratones. Típicamente, dichas secuencias de línea no germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o cerca de las CDR, o en regiones donde se sabe que se agrupan mutaciones somáticas.

Los anticuerpos humanos que se unen al antígeno predeterminado pueden ser resultado del intercambio de isotipo, de modo que se producen anticuerpos humanos que comprenden una cadena y de secuencia humana (tal como $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$ o $\gamma 3$) y una cadena ligera de secuencia humana (tal como kappa). Dichos anticuerpos humanos con intercambio de isotipo a menudo contienen una o más mutaciones somáticas, típicamente en la región variable y a menudo en o dentro de aproximadamente 10 restos de una CDR) como resultado de la maduración por afinidad y la selección de linfocitos B por el antígeno, particularmente después de la exposición a antígenos secundaria (o posterior). Estos anticuerpos humanos de alta afinidad pueden tener afinidades de unión (K_D) inferiores a 10^{-7} M, tal como inferiores a 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-10} M o incluso inferiores.

Otro aspecto de la presente divulgación incluye linfocitos B procedentes de ratones transgénicos o trans cromosómicos como se describe en el presente documento. Los linfocitos B se pueden usar para generar hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales humanos que se unen con alta afinidad (por ejemplo, inferior a 10^{-7} M) a PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanas.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad contra PD-1, PD-L1 o PD-L2 puede facilitarse mediante un método para expandir el repertorio de segmentos génicos de regiones variables humanas en un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de inmunoglobulina humana integrado, comprendiendo dicho método introducir en el genoma un transgén del gen V que comprende segmentos génicos de la región V que no están presentes en dicho transgén de inmunoglobulina humana integrado. Con frecuencia, el transgén de la región V es un cromosoma artificial de levadura que comprende una porción de una matriz de segmentos génicos V_H o V_L (V_K) humanos, como puede tener lugar de manera natural en un genoma humano o como pueden someterse a corte y empalme por separado mediante métodos recombinantes, que pueden incluir segmentos del gen V fuera de orden u omitidos. A menudo, el YAC contiene al menos cinco o más segmentos funcionales del gen V. En esta variación, es posible elaborar un ratón transgénico producido mediante el método de expansión del repertorio V, en donde el ratón expresa una cadena de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región variable codificada por un segmento génico de la región V presente en el transgén de la región V y una región C codificada en el transgén de Ig humana. Mediante el método de expansión del repertorio V se pueden generar ratones transgénicos que tengan al menos 5 genes V distintos; al igual que los ratones que contienen al menos aproximadamente 24 genes V o más. Algunos segmentos del gen V pueden no ser funcionales (por ejemplo, pseudogenes y similares); estos segmentos pueden conservarse o eliminarse selectivamente mediante métodos recombinantes disponibles para el experto en la técnica, si se desea.

Una vez que la línea germinal de ratón se ha genomanipulado para contener un YAC funcional con un repertorio de segmento V expandido, sustancialmente no presente en el transgén de Ig humana que contiene los segmentos de genes J y C, el rasgo se puede propagar y reproducir en otros fondos genéticos, incluyendo fondos donde el YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V expandido se cruza con una línea germinal de ratón que tiene un transgén de Ig humana diferente. Se pueden crear múltiples YAC funcionales que tengan un repertorio de segmento V expandido en una línea germinal para que funcionen con un transgén de Ig humana (o múltiples transgenes de Ig humana). Aunque en el presente documento se denominan transgenes YAC, dichos transgenes, cuando se integran en el genoma, pueden carecer sustancialmente de secuencias de levadura, tales como secuencias requeridas para la replicación autónoma en levadura; dichas secuencias pueden eliminarse opcionalmente mediante ingeniería genética (por ejemplo, digestión de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado u otro método adecuado) después de que la replicación en levadura ya no sea necesaria (es decir, antes de la introducción en una célula ES de ratón o en un procigoto de ratón). Los métodos para propagar el rasgo de expresión de inmunoglobulina de secuencia humana incluyen criar un ratón transgénico que tenga el uno o más transgenes de Ig humana y, opcionalmente, que también tenga un YAC funcional con un repertorio de segmento V expandido. Tanto los segmentos de genes V_H como V_L pueden estar presentes en el YAC. El ratón transgénico se puede criar con cualquier fondo deseado por el profesional, incluidos fondos que albergan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes de Ig humana y/o transgenes que codifican otras proteínas de linfocitos humanos. La divulgación también proporciona una inmunoglobulina de secuencia humana de alta afinidad producida por un ratón transgénico que tiene un transgén YAC de repertorio de región V expandido. Si bien lo anterior describe un aspecto preferido del animal transgénico de la divulgación, se contemplan otros aspectos que se han clasificado en cuatro categorías:

(1) Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada no reordenado y de cadena ligera reordenado;

(2) Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada no reordenado y de cadena ligera no reordenado;

(3) Animal transgénico que contiene un transgén de inmunoglobulina de cadena pesada reordenado y de cadena ligera no reordenado; y

(4) Animales transgénicos que contienen transgenes de inmunoglobulina de cadena pesada reordenados y de cadena ligera reordenados.

VI. Conjugados de anticuerpos/inmunotoxinas

En otro aspecto, la presente invención presenta anticuerpos PD-L1 humanos conjugados con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Cuando se conjugan con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial (por ejemplo, las destruya) para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaína, propanolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención se puede conjugar con un radioisótopo, por ejemplo, yodo radiactivo, para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado, tal como un cáncer.

Los anticuerpos PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanos conjugados se pueden usar con fines diagnósticos o pronósticos para controlar los niveles de polipéptidos en el tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado (no reivindicado). La detección se puede facilitar acoplando (es decir, uniendo físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, P-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos con grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Los conjugados de anticuerpos de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica determinada. El resto terapéutico no debe considerarse limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-gamma; o, modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otras citocinas o factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a anticuerpos se conocen bien, véanse, por ejemplo, Amon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), págs. 243 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2.^a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), págs. 623 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), págs. 475 506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), págs. 303 16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119 58 (1982).

VII. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de los anticuerpos monoclonales, o una o más porciones de unión a antígeno de los mismos (tales como fragmentos de unión a antígeno), de la presente divulgación, formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto de la divulgación, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos humanos aislados descritos en el presente documento. Preferentemente, cada uno de los anticuerpos de la composición se une a un epítipo preseleccionado distinto de PD-1, PD-L1 y/o PD-L2.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia combinada, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tal como agentes antiinflamatorios, FAME (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad), agentes inmunosupresores, quimioterápicos y agentes para la psoriasis. Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar junto con radioterapia. La administración conjunta con otros anticuerpos, tales como anticuerpos específicos de CD4 y anticuerpos específicos de IL-2, también se abarca por la invención.

Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) J. Pharm. Sci. 66:1 19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las obtenidas a partir de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como a partir de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas obtenidas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán el compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto o administrarlo conjuntamente con, un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y soluciones acuosas tamponadas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan *et al.* (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en la que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios a las composiciones.

Típicamente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una elevada concentración de fármaco. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el

uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Se puede conseguir una absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, se preparan dispersiones mediante la incorporación del principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la criodesecación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse una sola inyección en embolada, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos humanos de la invención pueden administrarse una o dos veces por semana mediante inyección subcutánea o una o dos veces al mes mediante inyección subcutánea. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Como se usa en el presente documento, la forma farmacéutica unitaria se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que han de tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario. La especificación para las formas farmacéuticas unitarias de la invención está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de preparación de compuestos de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

En una realización, un agente de la invención es un anticuerpo. Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo (es decir, una dosis eficaz) varía de aproximadamente 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg o de 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El experto en la técnica apreciará que determinados factores pueden influir en la dosis necesaria para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, el estado de salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. También se apreciará que la dosis eficaz de anticuerpo usada para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el transcurso de un tratamiento particular. Pueden producirse cambios en la dosis debido a los resultados de los ensayos de diagnóstico.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes liposolubles, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de farmacia. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para producir una sola forma farmacéutica variará dependiendo del sujeto que se va a tratar y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para producir una sola forma farmacéutica, generalmente, será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente el 0,001 por ciento a aproximadamente el noventa por ciento de principio activo, como alternativa, de aproximadamente el 0,005 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento o, como alternativa, de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento.

Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contienen dichos portadores que se conocen en la técnica como apropiados. Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de las composiciones de esta invención incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda requerirse.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "administración parenteral" y "administrado/a por vía parenteral" se refieren a modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e inyección intraesternal e infusión.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse mediante procedimientos de esterilización, anteriormente, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y a animales, se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contenga, por ejemplo, del 0,001 % al 90 % (por ejemplo, del 0,005 % al 70 %, tal como del 0,01 % al 30 %) de principio activo junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles de dosificaciones reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas o del éster, la sal o la amida del mismo, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados junto con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario que tenga experiencia en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o el veterinario podría empezar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrada de manera próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. Si bien es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición terapéutica de la invención se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos divulgados en las Pat. de EE. UU. N.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: Pat. de EE. UU. N.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; Pat. de EE. UU. N.º 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; Pat. de EE. UU. N.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamentos para suministrar un medicamento a una velocidad de infusión precisa; Pat. de EE. UU. N.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármacos; Pat. de EE. UU. N.º 4.439.196, que divulga un sistema de suministro de fármacos osmótico que tiene compartimentos multicámara; y la Pat. de EE. UU. N.º 4.475.196, que divulga un sistema de suministro de fármacos osmótico. Muchos otros de estos implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden formular para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesen la BHE (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de manera selectiva al interior de células u órganos específicos, mejorando de esta manera el suministro dirigido de fármacos (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Los restos de direccionamiento de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, Pat. de EE.UU. N.º 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína tensoactiva A (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), diferentes especies de las cuales pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas inventadas; pág. 120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véanse también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en otra realización, los liposomas incluyen un resto de direccionamiento. En otra realización más, los compuestos terapéuticos en los liposomas se suministran mediante inyección embolada en un sitio proximal al tumor o infección. La composición debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de administración mediante jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ha de preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición pueda suministrarse mediante jeringa. Además de agua, el portador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando el compuesto activo se encuentra protegido de una manera adecuada, como se ha descrito anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

VIII. Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos descritos en el presente documento (incluyendo derivados y conjugados de los anticuerpos, sujetos a los requisitos de las reivindicaciones) y las composiciones que contienen los anticuerpos se pueden usar en una diversidad de aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, mediante la modulación ascendente y descendente de la respuesta inmunitaria). Por ejemplo, la unión del ligando de PD-1 a PD-1 o B7-1 transmite una señal inhibitoria. Por lo tanto, la modulación de la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1, o entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7, da como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria. Los ligandos de PD-1 también pueden coestimular los linfocitos T. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos que bloquean la interacción entre un ligando de PD-1 y PD-1 o B7 pueden prevenir la señalización inhibitoria. En una realización, los anticuerpos que bloquean la señal coestimuladora del ligando de PD-1 bloquean una señal coestimuladora dirigida a una célula inmunitaria. Además, la ligadura de PD-L2 puede inducir la secreción de citocinas y la supervivencia de las células dendríticas. Por lo tanto, los anticuerpos que bloquean la ligadura de PD-L2 pueden inhibir la supervivencia de las células dendríticas y reducir la expresión de citocinas por parte de las células dendríticas y, a través de estos mecanismos, inhibir una respuesta inmunitaria. En particular, los anticuerpos descritos en el presente documento son útiles para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéuticas relacionadas con afecciones particulares mediadas por PD-1, PD-L1 y/o PD-L2, como se analiza, por ejemplo, en Keir *et al.* (2008) *Annu. Rev. Immunol.* 26:677; Sharpe *et al.*, (2007) *Nat. Immunol.* 8:239; Freeman *et al.* (2007) *J. Exp. Med.* 10:2223.

En un aspecto de la divulgación, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación son útiles para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéuticas con respecto a enfermedades neurodegenerativas (geriopsicosis, enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, neuropatía diabética, síndrome de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Machado-Joseph, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía diabética y enfermedad de Creutzfeldt-Jakob).

En otro aspecto de la divulgación, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento son aplicaciones útiles de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéuticas (tales como tratar y retrasar la aparición o progresión de las enfermedades) para enfermedades que aceleran la reacción inmunitaria, por ejemplo, asma, enfermedades autoinmunitarias (nefritis glomerular, artritis, enfermedad similar a la miocardiopatía dilatada, colitis ulcerosa, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, eritematosis sistémica, artritis reumatoide crónica, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatitis alérgica de contacto, polimiositis, paquidermia, periarteritis nodosa, fiebre reumática, vitiligo vulgaris, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad de Behcet, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Addison, dermatomiositis, miastenia grave, síndrome de Reiter, enfermedad de Graves, anemia

perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de esterilidad, hepatitis activa crónica, pénfigo, púrpura trombopénica autoinmunitaria y anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis crónica activa, enfermedad de Addison, síndrome antifosfolípido, alergia atópica, gastritis atrófica autoinmunitaria, aclorhidria autoinmunitaria, enfermedad celíaca, síndrome de Cushing, dermatomiositis, lupus discoide, eritematosis, síndrome de Goodpasture, tiroiditis de Hashimoto, atrofia suprarrenal idiopática, trombocitopenia idiopática, diabetes insulino dependiente, síndrome de Lambert-Eaton, hepatitis lupoide, algunos casos de linfopenia, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, penfigoide, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, uveítis facogénica, poliarteritis nodosa, autosíndromes poliglandulares, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, síndrome de Raynaud, policondritis recidivante, síndrome de Schmidt, esclerodermia limitada (o síndrome de la cresta), oftalmia simpática, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, tirotoxicosis, resistencia a la insulina tipo b, colitis ulcerosa y granulomatosis de Wegener).

En una realización, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno para su uso de la presente invención como se define en las reivindicaciones tienen aplicaciones terapéuticas y de prevención útiles (tales como tratar y retrasar la aparición o progresión de las enfermedades) y, por lo tanto, son para su uso para la terapia y/o prevención de enfermedades infecciosas persistentes (por ejemplo, enfermedades infecciosas víricas, incluyendo VPH, VHB, virus de la hepatitis C (VHC), retrovirus, tales como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2), virus del herpes, tales como virus de Epstein Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), VHS-1 y VHS-2, y virus de la gripe. Otros antígenos asociados con patógenos que pueden utilizarse como se describe en el presente documento son antígenos de diversos parásitos, que incluyen malaria, preferentemente péptidos de malaria basados en repeticiones de NANP. Además, se incluyen enfermedades bacterianas, fúngicas y por otros patógenos, tales como *Aspergillus*, *Brugia*, *Candida*, *Chlamydia*, *Coccidia*, *Cryptococcus*, *Dirofilaria*, *Gonococcus*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Paramecium*, *Pertussis*, *Plasmodium*, *Pneumococcus*, *Pneumocystis*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Toxoplasma* y *Vibrio cholerae*. Las especies de ejemplo incluyen *Neisseria gonorrhoea*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Trichomonas vaginalis*, *Haemophilus vaginalis*, *Streptococcus sp.* del grupo B, *Microplasma hominis*, *Hemophilus ducreyi*, *Granuloma inguinale*, *Lymphopathia venereum*, *Treponema pallidum*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella canis*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter fetus intestinalis*, *Leptospira pomona*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella ovis*, *Chlamydia psittaci*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus equuli*, *Salmonella abortus ovis*, *Salmonella abortus equi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium equi*, *Corynebacterium pyogenes*, *Actinobacillus seminis*, *Mycoplasma bovis genitalium*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia ramosa*, *Trypanosoma equiperdum*, *Babesia caballi*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*; o, un hongo, tal como, por ejemplo, *Paracoccidioides brasiliensis*; u otro patógeno, por ejemplo, *Plasmodium falciparum*. También se incluyen los patógenos prioritarios del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Estos incluyen agentes de categoría A, tales como variola mayor (viruela), *Bacillus anthracis* (ántrax), *Yersinia pestis* (peste), toxina de *Clostridium botulinum* (botulismo), *Francisella tularensis* (tularemia), filovirus (fiebre hemorrágica del Ébola, fiebre hemorrágica de Marburg), arnavirus (Lassa (fiebre de Lassa), junín (fiebre hemorrágica argentina) y virus relacionados); agentes de categoría B, tales como *Coxiella burnetii* (fiebre Q), especies de *Brucella* (brucelosis), *Burkholderia mallei* (muermo), alfavirus (encefalomielitis venezolana, encefalomielitis equina oriental y occidental), toxina de ricino de *Ricinus communis* (semillas de ricino), toxina épsilon de *Clostridium perfringens*; enterotoxina B de *Staphylococcus*, especies de *Salmonella*, *Shigella dysenteriae*, cepa O157:H7 de *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*; agentes de categoría C, tales como virus de Nipah, hantavirus, virus de la fiebre hemorrágica transmitidos por garrapatas, virus de encefalitis transmitidos por garrapatas, fiebre amarilla y tuberculosis multirresistente; helmintos, tales como *Schistosoma* y *Taenia*; y protozoos, tales como *Leishmania* (por ejemplo, *L. mexicana*) y *Plasmodium*.

En otro aspecto de la divulgación, los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de la presente divulgación son útiles para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, prevención y terapéuticas para el rechazo de injertos de órganos, enfermedad de injerto contra hospedador (EICH) y una enfermedad alérgica. En otra realización de la invención, los anticuerpos o los fragmentos de unión a antígeno de la invención son para su uso en aplicaciones de prevención y terapéuticas para enfermedades causadas por la atenuación de la reacción inmunitaria, en la que participa PD-1, PD-L1 y/o PD-L2, por ejemplo, un cáncer y una enfermedad infecciosa.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento se administran a un sujeto de acuerdo con métodos conocidos, tales como por vías de administración intravenosa (por ejemplo, como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo), subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intraarticular, intrasínovial, intratecal o inhalación.

Se trata a un sujeto si se obtienen uno o más resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos deseables. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: disminuir uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, aumentar la calidad de vida de aquellos que padecen la enfermedad, disminuir la dosis de otros medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

1. Métodos de cribado

Los anticuerpos para su uso de la presente invención pueden modular una respuesta inmunitaria modulando la

coestimulación (tal como anticuerpos que modulan la función de PD-1 o PD-L1). Los ensayos de cribado, incluyendo ensayos basados en células y no basados en células, proporcionan un método para identificar anticuerpos que modulan la interacción de un ligando de PD-1 y PD-1, o para identificar anticuerpos que modulan la interacción entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7.

En un aspecto, la divulgación se refiere a ensayos para cribar anticuerpos candidatos o de prueba que se unen a, o modulan la actividad de, PD-1, PD-L1 o PD-L2, por ejemplo, modulan la capacidad del polipéptido para interactuar con (por ejemplo, unirse a) su compañero de unión afín. En un aspecto de la divulgación, un método para identificar un anticuerpo para modular una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad del anticuerpo para modular, por ejemplo, potenciar o inhibir, la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1, y determinar además la capacidad del anticuerpo para modular la interacción entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7. En un aspecto de la divulgación, se selecciona un anticuerpo que modula la interacción entre el ligando de PD-1 y PD-1 (por ejemplo, sin modular la interacción entre el ligando de PD-1 y el polipéptido B7). En otro aspecto de la divulgación, se selecciona un anticuerpo que modula la interacción entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7 (por ejemplo, sin modular la interacción entre el ligando de PD-1 y PD-1).

En otro aspecto de la divulgación, un método para identificar un anticuerpo para disminuir una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad de un anticuerpo candidato para mejorar la interacción entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7 y seleccionar un anticuerpo que inhiba la interacción entre el ligando de PD-1 y el polipéptido B7. En otro aspecto de la divulgación, un método para identificar un anticuerpo para disminuir una respuesta inmunitaria implica determinar la capacidad del anticuerpo candidato para mejorar la interacción entre un ligando de PD-1 y PD-1 y seleccionar un anticuerpo que mejore la interacción entre el ligando de PD-1 y PD-1.

En un aspecto de la divulgación, un ensayo es un ensayo basado en células, que comprende poner en contacto una célula que expresa PD-1, PD-L1 o PD-L2, con un anticuerpo de prueba y determinar la capacidad del anticuerpo de prueba para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la unión de PD-1 o el objetivo del ligando de PD-1 a su compañero de unión. La determinación de la capacidad de PD-1, ligando de PD-1 o polipéptido B7 para unirse o interactuar con, su compañero de unión se puede lograr, por ejemplo, midiendo la unión directa o midiendo un parámetro de activación de células inmunitarias.

Por ejemplo, en un ensayo de unión directa, la proteína PD-1 o ligando de PD-1 (o sus respectivos polipéptidos diana) se puede acoplar con un radioisótopo o marcador enzimático de manera que la unión del ligando de PD-1 a PD-1 o al polipéptido B7 se puede determinar detectando la proteína marcada en un complejo. Por ejemplo, PD-1 o PD-1 se pueden marcar con ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^3H , directa o indirectamente, y el radioisótopo se puede detectar mediante recuento directo de radioemisión o mediante recuento de centelleo. Como alternativa, PD-1 o ligando de PD-1 se pueden marcar enzimáticamente con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa, y el marcador enzimático se puede detectar mediante determinación de la conversión de un sustrato apropiado en el producto.

También está dentro del alcance de esta divulgación determinar la capacidad de un compuesto para modular la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1 o entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7, sin el marcaje de ninguno de los que interactúan. Por ejemplo, se puede usar un microfisiómetro para detectar la interacción de PD-1 y un ligando de PD-1, o entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7, con su polipéptido diana, sin el marcaje de PD-1, ligando de PD-1, polipéptido B7, o el polipéptido diana (McConnell, H. M. *et al.* (1992) Science 257:1906-1912). Como se usa en el presente documento, un "microfisiómetro" (por ejemplo, citosensor) es un instrumento analítico que mide la velocidad a la que una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico direccionable por luz (LAPS, por sus siglas en inglés). Los cambios en esta velocidad de acidificación se pueden usar como indicador de la interacción entre el compuesto y el receptor.

En otro aspecto de la divulgación, la determinación de la capacidad del anticuerpo para antagonizar la interacción entre un conjunto dado de polipéptidos se puede lograr determinando la actividad de uno o más miembros del conjunto de polipéptidos. Por ejemplo, la actividad de PD-1 o un ligando de PD-1 se puede determinar detectando la inducción de un segundo mensajero celular (por ejemplo, actividad de tirosina cinasa), detectando la actividad catalítica/enzimática de un sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen indicador (que comprende un elemento regulador sensible a la diana unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, cloranfenicol acetil transferasa), o detectando una respuesta celular regulada por PD-1 o el ligando de PD-1. La determinación de la capacidad del anticuerpo para unirse o interactuar con dicho polipéptido se puede lograr, por ejemplo, midiendo la capacidad de un compuesto para modular la coestimulación o inhibición de las células inmunitarias en un ensayo de proliferación, o interfiriendo con la capacidad de dicho polipéptido para unirse a anticuerpos que reconocen una porción del mismo.

Los anticuerpos que bloquean o inhiben la interacción de un ligando de PD-1 con un receptor coestimulador, así como los anticuerpos que promueven una señal inhibitoria mediada por el ligando de PD-1, se pueden identificar por su capacidad para inhibir la proliferación de células inmunitarias y/o la función efectora, o para inducir anergia cuando se añaden a un ensayo *in vitro*. Por ejemplo, las células se pueden cultivar en presencia de un agente que estimule la transducción de señales a través de un receptor activador. Se pueden emplear varias lecturas reconocidas de activación celular para medir la proliferación celular o la función efectora (por ejemplo, la producción de anticuerpos,

la producción de citocinas, la fagocitosis) en presencia del agente activador. La capacidad de un anticuerpo de prueba para bloquear esta activación se puede determinar fácilmente midiendo la capacidad del anticuerpo para afectar a una disminución en la proliferación o la función efectora que se está midiendo, usando técnicas conocidas en la técnica.

Por ejemplo, se pueden ensayar los anticuerpos para determinar la capacidad de inhibir o mejorar la coestimulación en un ensayo de linfocitos T, como se describe en Freeman *et al.* (2000) J. Exp. Med. 192:1027 y Latchman *et al.* (2001) Nat. Immunol. 2:261. Los linfocitos T CD4+ se pueden aislar de PBMC humanas y estimularse con anticuerpo anti CD3 activador. La proliferación de linfocitos T se puede medir mediante la incorporación de ³H timidina. Se puede realizar un ensayo con o sin coestimulación de CD28 en el ensayo. Se pueden realizar ensayos similares con linfocitos T Jurkat y blastos de PHA de PBMC.

En otro aspecto, un ensayo de la presente divulgación es un ensayo acelular en el que PD-1 o un ligando de PD-1, o una porción biológicamente activa del mismo, se pone en contacto con un anticuerpo de prueba, y se determina la capacidad del anticuerpo de prueba para unirse al polipéptido, o una porción biológicamente activa del mismo. La unión del anticuerpo de prueba al polipéptido PD-1 o ligando de PD-1 se puede determinar directa o indirectamente como se ha descrito anteriormente. En otro aspecto más, el ensayo incluye poner en contacto el polipéptido, o porción biológicamente activa del mismo, con su compañero de unión para formar una mezcla de ensayo, poniendo en contacto la mezcla de ensayo con un anticuerpo de prueba y determinando la capacidad del anticuerpo de prueba para interactuar con el polipéptido en la mezcla de ensayo, en donde determinar la capacidad del anticuerpo de prueba para interactuar con el polipéptido comprende determinar la capacidad del anticuerpo de prueba para unirse preferentemente al polipéptido, o porción biológicamente activa del mismo, en comparación con el compañero de unión.

Por ejemplo, se puede usar un ligando de PD-1 y un polipéptido PD-1 para formar una mezcla de ensayo y se puede ensayar la capacidad de un anticuerpo de prueba para bloquear esta interacción determinando la capacidad de PD-1 para unirse al ligando de PD-1 y determinando la capacidad del ligando de PD-1 para unirse al polipéptido PD-1, mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión. La determinación de la capacidad de un polipéptido PD-1 para unirse a un ligando de PD-1 y la determinación de la capacidad de un ligando de PD-1 para unirse a un polipéptido B7 también se puede lograr usando una tecnología tal como el análisis de interacción biomolecular (BIA) en tiempo real (Sjolander, S. y Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo *et al.* (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). Como se usa en el presente documento, "BIA" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguna de las moléculas que interactúan (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR) se pueden usar como indicación de reacciones en tiempo real entre polipéptidos biológicos. PD-1, el ligando de PD-1 y el polipéptido B7 se pueden inmovilizar en un chip BIAcore y se pueden ensayar los anticuerpos para determinar su unión a PD-1, el ligando de PD-1 y el polipéptido B7. Se describe un ejemplo del uso de la tecnología BIA por Fitz *et al.* (1997) Oncogene 15:613.

Los ensayos acelulares de la presente divulgación son susceptibles de usar formas de proteínas tanto solubles como unidas a membrana (por ejemplo, un ligando de PD-1 o proteínas PD-1 o porciones biológicamente activas de los mismos, o compañeros de unión a los que se une un ligando de PD-1 o PD-1). En el caso de ensayos acelulares en los que se usa una proteína en forma unida a membrana (por ejemplo, un ligando de PD-1 de superficie celular o un receptor PD-1), puede ser deseable utilizar un agente solubilizante de modo que la forma unida a membrana de la proteína se mantenga en solución. Los ejemplos de tales agentes solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metilglucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, isotrideciliéter de etilenglicol)_n, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO), o sulfonato de N-dodecil=N,N-dimetil-3-amonio-1-propano.

En uno o más aspectos de los métodos de ensayo descritos anteriormente, puede ser deseable inmovilizar PD-1, un ligando de PD-1 y un polipéptido B7, o un polipéptido diana apropiado, para facilitar la separación de complejos de formas no complejadas de una o ambas proteínas, así como para adaptarse a la automatización del ensayo. La unión de un anticuerpo de prueba a PD-1 o un ligando de PD-1 se puede lograr en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Los ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microvaloración, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En un aspecto de la divulgación, se puede proporcionar una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/PD-1, ligando de PD-1 o polipéptido B7, o proteínas de fusión glutatión-S-transferasa/diana, se pueden adsorber en perlas de glutatión Sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microvaloración derivatizadas con glutatión, que a continuación se combinan con el compuesto de prueba, y la mezcla se incuba en condiciones propicias para la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las perlas o los pocillos de las placas de microvaloración se lavan para eliminar cualquier componente no unido, la matriz se inmoviliza en el caso de las perlas, el complejo se determina directa o indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, los complejos se pueden disociar de la matriz y se puede determinar el nivel de unión o actividad de PD-1, ligando de PD-1 o polipéptido B7 usando técnicas estándar.

En un aspecto alternativo de la divulgación, la determinación de la capacidad del compuesto de prueba para modular

la actividad de PD-1 o un ligando de PD-1 se puede lograr determinando la capacidad del anticuerpo de prueba para modular la actividad de un polipéptido que funciona cadena abajo de PD-1 o el ligando de PD-1, por ejemplo, un polipéptido que interactúa con el ligando de PD-1, o un polipéptido que funciona cadena abajo de PD-1, por ejemplo, interactuando con el dominio citoplásmico de PD-1. Por ejemplo, se pueden determinar los niveles de segundos mensajeros, se puede determinar la actividad del polipéptido interactivo sobre una diana apropiada, o se puede determinar la unión del interactivo a una diana apropiada como se ha descrito previamente.

Esta divulgación se refiere además a anticuerpos novedosos identificados mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente. Por consiguiente, un anticuerpo identificado como se describe en el presente documento puede usarse además en un modelo animal apropiado. Por ejemplo, un anticuerpo identificado como se describe en el presente documento se puede usar en un modelo animal para determinar la eficacia, toxicidad o efectos secundarios del tratamiento con tal anticuerpo. Como alternativa, se puede usar un anticuerpo identificado como se describe en el presente documento en un modelo animal para determinar el mecanismo de acción de tal anticuerpo. Además, esta divulgación se refiere a usos de anticuerpos novedosos identificados mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente para tratamientos como se describe en el presente documento.

2. Métodos profilácticos

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para prevenir en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con una respuesta inmunitaria no deseada o no deseable. Los sujetos en riesgo de padecer una enfermedad que se beneficiarían del tratamiento con los anticuerpos o métodos mencionados en los párrafos se pueden identificar, por ejemplo, mediante cualquiera o una combinación de ensayos de diagnóstico o pronóstico conocidos en la técnica. La administración de un anticuerpo profiláctico puede tener lugar antes de la manifestación de síntomas asociados con una respuesta inmunitaria no deseada o no deseable. El anticuerpo apropiado usado para el tratamiento se puede determinar basándose en indicaciones clínicas y se puede identificar, por ejemplo, usando ensayos de cribado descritos en el presente documento.

3. Métodos terapéuticos

Otro aspecto de la divulgación se refiere a métodos terapéuticos para modular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, modulando la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1 y/o un ligando de PD-1 y un polipéptido B7. Por ejemplo, la modulación de la interacción entre PD-1 y un ligando de PD-1, o entre un ligando de PD-1 y un polipéptido B7, da como resultado la modulación de la respuesta inmunitaria. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos que bloquean la interacción entre PD-1 y el ligando de PD-1 pueden prevenir la señalización inhibitoria. Los ligandos de PD-1 también pueden mejorar las señales coestimuladoras en los linfocitos T. Por lo tanto, en otro aspecto de la divulgación, los anticuerpos que impiden que el ligando de PD-1 proporcione una señal coestimuladora pueden inhibir la coestimulación de los linfocitos T.

Estos anticuerpos moduladores se pueden administrar *in vitro* (por ejemplo, poniendo en contacto la célula con un anticuerpo) o, como alternativa, *in vivo* (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tal, la presente divulgación se refiere a métodos para tratar a un individuo que padece una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la modulación de una respuesta inmunitaria, por ejemplo, mediante la modulación de la interacción entre un ligando de PD-1 y PD-1, o un polipéptido B7.

4. Regulación negativa de las respuestas inmunitarias

Hay numerosos aspectos de la divulgación para regular positivamente la función inhibitoria o regular negativamente la función coestimuladora de un ligando de PD-1 para regular negativamente de este modo las respuestas inmunitarias. La regulación negativa puede consistir en inhibir o bloquear una respuesta inmunitaria que ya está en curso, o puede implicar prevenir la inducción de una respuesta inmunitaria. Las funciones de las células inmunitarias activadas se pueden inhibir regulando negativamente las respuestas de las células inmunitarias, o induciendo anergia específica en las células inmunitarias, o ambas cosas.

Por ejemplo, la respuesta inmunitaria se puede modular negativamente usando: anticuerpos anti ligando de PD-1 que bloquean la coestimulación por el ligando de PD-1 (por ejemplo, sin afectar ni aumentar la interacción entre PD-L1 y PD-1) o que promueven la unión de un ligando de PD-1 con PD-1 (por ejemplo, sin afectar o inhibir la coestimulación por el ligando de PD-1).

En un aspecto de la divulgación, se induce tolerancia contra antígenos específicos administrando conjuntamente un antígeno con un anticuerpo que bloquea la coestimulación del ligando de PD-1. Por ejemplo, se puede inducir tolerancia a proteínas específicas. En un aspecto, se pueden inhibir las respuestas inmunitarias a alérgenos o a proteínas exógenas frente a las cuales no es deseable una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los pacientes que reciben Factor VIII con frecuencia generan anticuerpos contra este factor de coagulación. La administración conjunta de un anticuerpo que bloquea una señal coestimuladora mediada por el ligando de PD-1 o un anticuerpo que estimula una señal inhibitoria mediada por PD-1 junto con factor VIII recombinante (o unido físicamente al factor VIII, por ejemplo, mediante reticulación) puede provocar una modulación descendente.

En un aspecto de la divulgación, dos agentes separados que modulan negativamente las respuestas inmunitarias se pueden combinar como una única composición o administrarse por separado (simultánea o secuencialmente) para regular negativamente más eficazmente las respuestas inmunitarias mediadas por células inmunitarias en un sujeto.

Además, se puede usar una cantidad terapéuticamente activa de uno o más de los anticuerpos en cuestión junto con otros reactivos de modulación descendente para influir en las respuestas inmunitarias. Los ejemplos de otros reactivos inmunomoduladores incluyen, sin limitación, anticuerpos que bloquean una señal coestimuladora (por ejemplo, contra CD28 o ICOS), anticuerpos que actúan como agonistas de CTLA-4 y/o anticuerpos contra otros marcadores de células inmunitarias (por ejemplo, contra CD40, contra el ligando de CD40 o contra citocinas), proteínas de fusión (por ejemplo, CTLA-4-Fc) y fármacos inmunosupresores (por ejemplo, rapamicina, ciclosporina A o FK506).

La regulación negativa o la prevención de la coestimulación del ligando de PD-1, o la promoción de una interacción entre un ligando de PD-1 y PD-1 es útil para modular negativamente la respuesta inmunitaria, por ejemplo, en situaciones de trasplante de tejido, piel y órganos, en la enfermedad de injerto contra hospedador (EICH), o en enfermedades inflamatorias tales como lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple. Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células inmunitarias da como resultado una destrucción tisular reducida en el trasplante de tejido. Típicamente, en los trasplantes de tejido, el rechazo del trasplante se inicia cuando las células inmunitarias lo reconocen como extraño, seguido de una reacción inmunitaria que destruye el trasplante. La administración de un anticuerpo que inhibe la coestimulación del ligando de PD-1 solo o junto con otro agente de modulación descendente, antes o en el momento del trasplante puede promover la generación de una señal inhibidora. Además, la inhibición de las señales coestimuladoras del ligando de PD-1, o la promoción de un ligando de PD-1 o señales inhibidoras de PD-1, también pueden ser suficientes para anergizar las células inmunitarias, induciendo así tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia a largo plazo mediante el bloqueo de una señal coestimuladora mediada por el ligando de PD-1 puede evitar la necesidad de una administración repetida de estos reactivos bloqueantes.

Para lograr suficiente inmunosupresión o tolerancia en un sujeto, también puede ser deseable bloquear la función coestimuladora de otros polipéptidos. Por ejemplo, puede ser deseable bloquear la función de B7-1, B7-2 o B7-1 y B7-2 administrando una forma soluble de una combinación de péptidos que tienen una actividad de cada uno de estos antígenos, bloqueando los anticuerpos contra estos antígenos o bloqueando pequeñas moléculas (por separado o juntas en una única composición) antes o en el momento del trasplante. Como alternativa, puede ser deseable promover la actividad inhibidora de un ligando de PD-1 o PD-1 e inhibir una actividad coestimuladora de B7-1 y/o B7-2. Otros agentes de modulación descendente que se pueden usar en relación con los métodos de modulación descendente de la divulgación incluyen, por ejemplo, agentes que transmiten una señal inhibidora a través de CTLA-4, formas solubles de CTLA-4, anticuerpos que activan una señal inhibidora a través de CTLA-4, anticuerpos bloqueantes contra otros marcadores de células inmunitarias o formas solubles de otros pares de ligandos de receptores (por ejemplo, agentes que interrumpen la interacción entre CD40 y el ligando de CD40 (por ejemplo, anticuerpos anti ligando de CD40)), anticuerpos contra citocinas o fármacos inmunosupresores.

La modulación descendente de las respuestas inmunitarias también es útil en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria. Muchos trastornos autoinmunitarios son el resultado de una activación inadecuada de células inmunitarias que reaccionan contra los propios tejidos y que promueven la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. Prevenir la activación de células inmunitarias autorreactivas puede reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad. La administración de reactivos que bloquean la coestimulación de células inmunitarias interrumpiendo las interacciones entre el ligando de PD-1 y los polipéptidos B7, o promoviendo la interacción entre el ligando de PD-1 y PD-1, sin modular o modulando negativamente la interacción entre el ligando de PD-1 y un polipéptido B7, es útil para inhibir la activación de las células inmunitarias y prevenir la producción de autoanticuerpos o citocinas que pueden estar implicadas en el proceso de la enfermedad. Además, los agentes que promueven una función inhibidora de un ligando de PD-1 o PD-1 pueden inducir una tolerancia específica del antígeno de las células inmunitarias autorreactivas, lo que podría conducir a un alivio a largo plazo de la enfermedad. La eficacia de los reactivos para prevenir o aliviar trastornos autoinmunitarios se puede determinar usando varios modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunitarias humanas. Los ejemplos incluyen encefalitis autoinmunitaria experimental murina, lupus eritematoso sistémico en ratones MRL/lpr/lpr o ratones híbridos NZB, artritis autoinmunitaria con colágeno murino, diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB, y miastenia grave experimental murina (véase, por ejemplo, Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, Nueva York, Tercera edición 1993, capítulo 30).

La inhibición de la activación de las células inmunitarias es útil terapéuticamente en el tratamiento de la alergia y reacciones alérgicas, por ejemplo, inhibiendo la producción de IgE. Se puede administrar un anticuerpo que promueva un ligando de PD-1 o una función inhibidora de PD-1 a un sujeto alérgico para inhibir las respuestas alérgicas mediadas por células inmunitarias en el sujeto. La inhibición de la coestimulación del ligando de PD-1 de células inmunitarias o la estimulación de un ligando de PD-1 o de la vía inhibidora de PD-1 puede ir acompañada de la exposición al alérgeno junto con polipéptidos MHC apropiados. Las reacciones alérgicas pueden ser de naturaleza sistémica o local, dependiendo de la ruta de entrada del alérgeno y del patrón de depósito de IgE en los mastocitos o basófilos. Por lo tanto, la inhibición de respuestas alérgicas mediadas por células inmunitarias local o sistémicamente mediante la administración de una forma inhibidora de un agente que inhibe la interacción de un ligando de PD-1 con un receptor coestimulador, o un anticuerpo que promueve una función inhibidora de un ligando de PD-1 o PD-1.

La inhibición de la activación de las células inmunitarias a través del bloqueo de la coestimulación del ligando de PD-1, o a través de la promoción de la interacción entre un ligando de PD-1 y PD-1, también puede ser importante terapéuticamente en infecciones víricas de las células inmunitarias. Por ejemplo, en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la replicación vírica se estimula por la activación de las células inmunitarias. La modulación de estas interacciones puede dar como resultado la inhibición de la replicación vírica y, por lo tanto, mejorar el curso del SIDA. La modulación de estas interacciones también puede ser útil para promover el mantenimiento del embarazo. El ligando de PD-1 normalmente se expresa en gran medida en los trofoblastos placentarios, la capa de células que forma la interfaz entre la madre y el feto y puede desempeñar una función en la prevención del rechazo materno del feto. Las mujeres en riesgo de aborto espontáneo (por ejemplo, aquellas que previamente han tenido un aborto espontáneo o aquellas que han tenido dificultades para concebir) debido al rechazo inmunológico del embrión o feto pueden tratarse con agentes que modulen estas interacciones.

La regulación negativa de una respuesta inmunitaria mediante la modulación de la coestimulación del ligando de PD-1 o mediante la modulación de la unión del ligando de PD-1/PD-1 también puede ser útil en el tratamiento de un ataque autoinmunitario de tejidos autólogos. Por ejemplo, el ligando de PD-1 normalmente se expresa en gran medida en el corazón y puede protegerlo de un ataque autoinmunitario. Esto se evidencia por el hecho de que el ratón con genes inactivados Balb/c PD-1 presenta un ataque autoinmunitario masivo al corazón con trombosis. Por lo tanto, las afecciones que son causadas o exacerbadas por un ataque autoinmunitario (por ejemplo, en este ejemplo, cardiopatía, infarto de miocardio o aterosclerosis) pueden mejorarse mediante la modulación de estas interacciones. Por lo tanto, se encuentra dentro del alcance de la divulgación modular afecciones exacerbadas por un ataque autoinmunitario, tales como trastornos autoinmunitarios (así como afecciones tales como cardiopatía, infarto de miocardio y aterosclerosis).

5. Regulación positiva de las respuestas inmunitarias

También es útil terapéuticamente el bloqueo de la interacción de un ligando de PD-1 con PD-1 o B7-1 como medio para regular positivamente una respuesta inmunitaria. La invención proporciona anticuerpos para uso terapéutico para regular positivamente una respuesta inmunitaria. La regulación positiva de las respuestas inmunitarias puede consistir en mejorar una respuesta inmunitaria existente o provocar una respuesta inmunitaria inicial. Por ejemplo, mejorar una respuesta inmunitaria usando las composiciones y métodos en cuestión es útil en casos de infecciones con microbios (por ejemplo, bacterias, virus o parásitos). En una realización, se usa un anticuerpo que bloquea la interacción de un ligando de PD-1 con PD-1 para mejorar la respuesta inmunitaria. Un anticuerpo de este tipo (por ejemplo, un anticuerpo no activante que bloquea la unión de PD-L1 a PD-1) es terapéuticamente útil en situaciones donde sería beneficiosa la regulación positiva de las respuestas mediadas por células y anticuerpos. Los trastornos de ejemplo incluyen enfermedades víricas de la piel, tales como herpes o culebrilla, en cuyo caso dicho agente se puede suministrar por vía tópica en la piel. Además, las enfermedades víricas sistémicas, tales como la gripe, el resfriado común y la encefalitis, podrían aliviarse mediante la administración sistémica de dichos agentes.

Como alternativa, las respuestas inmunitarias se pueden mejorar en un paciente infectado a través de un enfoque *ex vivo*, por ejemplo, eliminando células inmunitarias del paciente, poniendo en contacto las células inmunitarias *in vitro* con un anticuerpo que bloquea la interacción de un ligando de PD-1 con PD-1 e introduciendo de nuevo las células inmunitarias estimuladas *in vitro* en el paciente.

En determinados casos, puede ser deseable administrar además otros agentes que regulen positivamente las respuestas inmunitarias, por ejemplo, formas de otros miembros de la familia B7 que transducen señales a través de receptores coestimuladores, para aumentar aún más la respuesta inmunitaria.

Un anticuerpo que bloquea la interacción de un ligando de PD-1 con PD-1 o B7-1 se puede usar de forma profiláctica en vacunas contra diversos polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos procedentes de patógenos). La inmunidad contra un patógeno (por ejemplo, un virus) se puede inducir vacunando con una proteína vírica junto con un anticuerpo que bloquea la interacción de un ligando de PD-1 con PD-1 o B7-1 en un adyuvante apropiado.

En otra realización, la regulación positiva o la mejora de una función de respuesta inmunitaria, como se describe en el presente documento, es útil en la inducción de inmunidad tumoral.

En otra realización, la respuesta inmunitaria se puede estimular mediante los métodos descritos en el presente documento, de modo que se supere la tolerancia preexistente. Por ejemplo, se pueden inducir respuestas inmunitarias contra antígenos contra los cuales un sujeto no puede crear una respuesta inmunitaria significativa, por ejemplo, contra un antígeno autólogo, tal como un antígeno específico de tumor, mediante la administración de un anticuerpo que bloquea la interacción de un ligando de PD-1 con PD-1. En una realización, se puede administrar conjuntamente un antígeno autólogo, tal como un antígeno específico de tumor. En otra realización, se puede estimular una respuesta inmunitaria contra un antígeno (por ejemplo, un antígeno autólogo) para tratar un trastorno neurológico. En otra realización, los agentes en cuestión se pueden usar como adyuvantes para estimular las respuestas a antígenos exógenos en el proceso de inmunización activa.

En una realización, se obtienen células inmunitarias de un sujeto y se cultivan *ex vivo* en presencia de un anticuerpo como se describe en el presente documento, para expandir la población de células inmunitarias y/o potenciar la activación de células inmunitarias. En una realización adicional las células inmunitarias se administran a continuación a un sujeto. Las células inmunitarias se pueden estimular *in vitro*, por ejemplo, proporcionando a las células

Se describen otras realizaciones de la presente invención en los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

Los ejemplos descritos a continuación describen la generación de anticuerpos monoclonales adecuados para propósitos terapéuticos que se dirigen a PD-1 humana, PD-L1 y PD-L2. Los anticuerpos anti PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanos compuestos se generaron a partir de anticuerpos anti EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 humanos de ratón, respectivamente. Los segmentos de la secuencia de la región V humana se adquirieron de las bases de datos de secuencias de anticuerpos humanos no relacionadas (línea germinal y línea no germinal). Cada segmento de secuencia seleccionado (así como las uniones entre segmentos) se sometió a ensayo con respecto a la posibilidad de unirse al MHC de clase II usando algoritmos de predicción de unión. Todas las variantes de secuencia de anticuerpos humanos compuestos finales se diseñaron para impedir epítopos de linfocitos T. Las regiones de la región V de anticuerpos humanos compuestos se generaron usando oligonucleótidos sintéticos que codifican combinaciones de segmentos de secuencia humana. A continuación, estos se clonaron en vectores que contenían regiones constantes humanas, y se produjeron anticuerpos y se ensayaron con respecto a la unión a antígenos diana por ELISA de competencia. Los anticuerpos anti PD-1 y anti PD-L2 divulgados en los ejemplos están fuera del alcance de la invención, como se define en las reivindicaciones, pero se conservan para información previa.

Ejemplo 1: Diseño de secuencias de región variable de anticuerpos humanos compuestos

Se produjeron modelos estructurales de las regiones V EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 de ratón usando Swiss Pdb y se analizaron para identificar aminoácidos "de restricción" importantes en las regiones V de ratón que podrían ser esenciales para las propiedades de unión de los anticuerpos. Sólo se consideraron importantes los restos contenidos dentro de las CDR, incluidos los restos de CDR definidos según las definiciones de Kabat y Chothia.

A partir del análisis anterior, se consideró que podrían crearse formas humanas compuestas de EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 con una amplia latitud de secuencias fuera de las CDR pero con un menú estrecho de posibles restos alternativos dentro de las secuencias de CDR. El análisis preliminar indicó que los segmentos de secuencia correspondientes de varios anticuerpos humanos podrían combinarse para crear CDR similares o idénticas a las de las secuencias de ratón. Para regiones fuera y flanqueantes de las CDR, se identificó una amplia selección de segmentos de secuencia humana como posibles componentes de las novedosas regiones variables de anticuerpos humanos compuestos.

Basándose en el análisis anterior, se seleccionó un gran conjunto preliminar de segmentos de secuencia que podrían usarse para crear variantes de anticuerpos humanos compuestos EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 y se analizaron mediante algoritmos de predicción de unión de MHC de clase II y búsqueda con BLAST a través de una base de datos patentada de secuencia de anticuerpos conocida relacionada con epítopos de linfocitos T. Se descartaron segmentos de secuencia donde se identificaron posibles péptidos de unión al MHC de clase II o donde se puntuaron aciertos significativos contra la base de datos de epítopos de linfocitos T conocidos. Esto dio como resultado un conjunto reducido de segmentos y se analizaron de nuevo combinaciones de estos, como anteriormente, para asegurar que las uniones entre segmentos no contuvieran posibles epítopos de linfocitos T. A continuación, los segmentos seleccionados se combinaron para producir secuencias de región V de cadena pesada y ligera para la síntesis. Para los tres anticuerpos, se construyeron cinco cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras con las secuencias detalladas a continuación;

Antígeno	Secuencias VH compuestas	Secuencias VK compuestas
PD-1	Figura 2 (A-E)	Figura 3 (A-D)
PD-L1	Figura 4 (A-E)	Figura 5 (A-D)
PD-L2	Figura 6 (A-E)	Figura 7 (A-D)

Los segmentos de secuencia usados para producir estas secuencias de anticuerpos humanos compuestos se detallan en las Tablas 1, 2 y 3 para anticuerpos contra PD-1, PD-L1 y PD-L2, respectivamente.

Tabla 1. Derivación de segmentos de secuencia humana que comprenden los anticuerpos humanos compuestos anti PD-1

N.º de referencia de GenBank	Secuencia VH3	(a)
BAA75018	QVQLVQSGHEVKQPGASVK (SEQ ID NO:82)	
AAG00910	MSCKASGYSFTS (SEQ ID NO:83)	
AAY18543	SGYSFTSSWI (SEQ ID NO:84)	
AAY57105	WIHWV (SEQ ID NO:85)	
AAG00910	KQ	
AAD16517	QAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:86)	
AAD53797	GLEWIGYIYPS (SEQ ID NO:87)	
CAA08742	STGF (SEQ ID NO:88)	
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO:89)	
AAT96419	QKF	
AAA17939	KDR	
AAR02530	DRAT (SEQ ID NO:90)	
AAA17939	TLT	
AAM87977	TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO:91)	
CAA78534	STAYMELSSLRSED TAVYYCARWRD (SEQ ID NO:92)	
AAV40096	DSSGY (SEQ ID NO:93)	
AAR38557	YHA	
AAW29142	AMD	
IGHJ4	DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:94)	
N.º de referencia de GenBank	Secuencia VH4	(b)
BAA75018	QVQLVQSGHEVKQPGASVK (SEQ ID NO:82)	
AAG00910	MSCKASGYSFTS (SEQ ID NO:83)	
AAY18543	SGYSFTSSWI (SEQ ID NO:84)	
AAA02616	HWVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:95)	
AAD53797	GLEWIGYIYPS (SEQ ID NO:87)	
CAA08742	STGF (SEQ ID NO:88)	
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO:89)	
AAT96419	QKF	
AAA17939	KDR	
AAR02530	DRAT (SEQ ID NO:90)	
AAA17939	TLT	
AAM87977	TADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR (SEQ ID NO:91)	
CAA78534	STAYMELSSLRSED TAVYYCARWRD (SEQ ID NO:92)	
AAV40096	DSSGY (SEQ ID NO:93)	
AAR38557	YHA	
AAW29142	AMD	
IGHJ4	DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:94)	
N.º de referencia de GenBank	Secuencia Vk3	(c)
AAY16615	EIVLTQSPATLSLSPGQR (SEQ ID NO:96)	
AAD09377	RLTISCRASQ (SEQ ID NO:97)	
AAA99362	TISCRASQSVST (SEQ ID NO:98)	
AAL04518	SVSTSGYSYMHW (SEQ ID NO:99)	
AAA58912	WYQQKPDQSPKT T TK (SEQ ID NO:100)	
AAD16648	FGS	
AAD19478	SNLESG (SEQ ID NO:101)	
AAL10884	GIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFA (SEQ ID NO: 102)	
AAD16559	PEDFATYYCQHS (SEQ ID NO:103)	
AAA99326	SW	
AAC16811	EIP	
J2 humana	YTFGQGKLEIK (SEQ ID NO:104)	

(continuación)

N.º de referencia de GenBank	Secuencia Vκ4	(d)
AAB53267	DIVLTQSP (SEQ ID NO:105)	
AAY16615	IVLTQSPATLSLSPGQR (SEQ ID NO:106)	
AAD09377	RLTISCRASQ (SEQ ID NO:97)	
AAA99362	TISCRASQSVST (SEQ ID NO:98)	
AAL04518	SVSTSGYSYMHV (SEQ ID NO:99)	
AAA58912	WYQQKPDQSPKT T TK (SEQ ID NO:100)	
AAD16648	FGS	
AAD19478	SNLESG (SEQ ID NO:101)	
AAL10884	GIPARFSGSGSGTDFLTISLSEPEDFA (SEQ ID NO:102)	
AAD16559	PEDFATYYCQHS (SEQ ID NO:103)	
AAA99326	SW	
AAC16811	EIP	
J2 humana	YTFGQGKLEIK (SEQ ID NO:104)	

Tabla 2. Derivación de segmentos de secuencia humana que comprenden los anticuerpos humanos compuestos anti PD-L1

N.º de referencia de GenBank	Secuencia VH2	(a)
ABI50688	EVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO:107)	
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO:108)	
ABI50688	SCKASGYTFTSY (SEQ ID NO:109)	
AAC50839	SYVMHWV (SEQ ID NO:110)	
CAC43594	WVKQ (SEQ ID NO:111)	
AAA18267	QAPGQRLEWIG (SEQ ID NO:112)	
ABF20472	GY	
AAD30737	VNPF (SEQ ID NO:113)	
CAL06274	NDGT (SEQ ID NO:114)	
CAC43212	KYN	
CAC87219	YNE	
CAD31770	EM	
AAR32413	FKGR (SEQ ID NO:115)	
AAG30515	GRAT (SEQ ID NO:116)	
ABA62048	TLT	
ABI50549	TSD	
AAR32572	DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA (SEQ ID NO:117)	
AAC18225	AVYYCARQA (SEQ ID NO:118)	
AAV39747	AWGY (SEQ ID NO:119)	
IGHJ5*02	PWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:120)	
N.º de referencia de GenBank	Secuencia VH4	(b)
ABI50688	EVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO:107)	
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO:108)	
ABI50688	SCKASGYTFTSY (SEQ ID NO:109)	
AAC50839	SYVMHWV (SEQ ID NO:110)	
AAA18267	WVRQAPGQRLEWIG (SEQ ID NO:121)	
ABF20472	GY	
AAD30737	VNPF (SEQ ID NO:113)	
CAL06274	NDGT (SEQ ID NO:114)	
CAC43212	KYN	
CAC87219	YNE	
CAD31770	EM	
AAR32413	FKGR (SEQ ID NO:115)	
AAG30515	GRAT (SEQ ID NO:116)	
ABA62048	TLT	
ABI50549	TSD	
AAR32572	DKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA (SEQ ID NO:117)	
AAC18225	AVYYCARQA (SEQ ID NO:118)	
AAV39747	AWGY (SEQ ID NO:119)	
IGHJ5*02	PWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:120)	

(continuación)

N.º de referencia de GenBank	Secuencia Vk1	(c)
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO:122)	
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO:123)	
AAQ21828	ESV	
CAA51101	VE	
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO:124)	
AAY33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO:125)	
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:126)	
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO:127)	
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO:128)	
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (SEQ ID NO:129)	
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO:130)	
AAL04518	EEEDAA (SEQ ID NO:131)	
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO:132)	
CAK50767	SR	
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO:133)	
J2 humana	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:104)	
N.º de referencia de GenBank	Secuencia Vk2	(d)
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO:122)	
CAE54363	IVLTQSPATLSLSPGE (SEQ ID NO:134)	
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO:123)	
AAQ21828	ESV	
CAA51101	VE	
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO:124)	
AAY33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO:125)	
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:126)	
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO:127)	
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO:128)	
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (SEQ ID NO:129)	
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO:130)	
AAA58912	TINSLEAEDAA (SEQ ID NO:135)	
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO:132)	
CAK50767	SR	
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO:133)	
J2 humana	YTFGQGTKT FTK (SEQ ID NO:104)	
N.º de referencia de GenBank	Secuencia Vk4	(e)
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO:122)	
CAE54363	IVLTQSPATLSLSPGE (SEQ ID NO:134)	
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO:123)	
AAQ21828	ESV	
CAA51101	VE	
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO:124)	
AAY33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO:125)	
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:126)	
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO:127)	
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO:128)	
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (SEQ ID NO:129)	
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO:130)	
AAA58912	TINSLEAEDAATYFC (SEQ ID NO:136)	
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO:132)	
CAK50767	SR	
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO:133)	
J2 humana	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:104)	

Tabla 3. Derivación de segmentos de secuencia humana que comprenden los anticuerpos humanos compuestos anti PD-L2

N.º de referencia de GenBank	Secuencia VH2	(a)
ABF83419	QVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO:137)	
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO:108)	
ABF83419	SCKASGYTFTGY (SEQ ID NO:138)	
AAL17955	TMHWV (SEQ ID NO:139)	
CAC43594	WVKQ (SEQ ID NO:111)	
AAL17955	QAPG (SEQ ID NO:140)	
AAF40162	GQGLEWIG (SEQ ID NO:141)	
AAR02558	GYINP (SEQ ID NO:142)	
AAR32283	INPRSG (SEQ ID NO:143)	
AAR02553	GYT	
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO:89)	
AAT96419	QKF	
AAA17939	KDR	
AAB06403	RTT	
AAA17939	TLT	
AAG30529	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:91)	
ABE66740	DTAVYYCARPW (SEQ ID NO:144)	
ABK81281	WFAYWGQGT (SEQ ID NO:145)	
IGHJ4	YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:146)	
N.º de referencia de GenBank	Secuencia VH4	(b)
ABF83419	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGY (SEQ ID NO:147)	
AAL17955	TMHWVRQAPG (SEQ ID NO:148)	
AAF40162	GQGLEWIG (SEQ ID NO:141)	
AAR02558	GYINP (SEQ ID NO:142)	
AAR32283	INPRSG (SEQ ID NO:143)	
AAR02553	GYT	
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO:89)	
AAT96419	QKF	
AAA17939	KDR	
AAB06403	RTT	
AAA17939	TLT	
AAG30529	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:91)	
ABE66740	DTAVYYCARPW (SEQ ID NO:144)	
ABK81281	WFAYWGQGT (SEQ ID NO:145)	
IGHJ4	YWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO:146)	
N.º de referencia de GenBank	Secuencia Vk2	(c)
AAD16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO:149)	
CAA31193	PASL (SEQ ID NO:150)	
AAA58913	LSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO:151)	
AAQ99244	CKSSQSLL (SEQ ID NO:152)	
ABA71421	LNS	
AAD19451	GN	
AAS86065	QK	
AAD 14073	KNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO:153)	
AAZ09126	RFTGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO:154)	
CAA31484	NDY	
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO:155)	
J1 humana	TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:156)	

(continuación)

N.º de referencia de GenBank	Secuencia Vk3	(d)
AAD16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO:149)	
AAA58913	VMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO:157)	
AAQ99244	CKSSQSLL (SEQ ID NO:152)	
ABA71421	LNS	
AAD19451	GN	
AAS86065	QK	
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO:153)	
AAZ09126	RFTGSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO:154)	
CAA31484	NDY	
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO:155)	
J1 humana	TFGQGTKT FTK (SEQ ID NO:156)	
N.º de referencia de GenBank	Secuencia Vk4	(e)
AAD16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO:149)	
AAA58913	VMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO:157)	
AAQ99244	CKSSQSLL (SEQ ID NO:152)	
ABA71421	LNS	
AAD19451	GN	
AAS86065	QK	
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO:153)	
CAD44754	RFSGSGSGTDFLTITSSSLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO: 158)	
CAA31484	NDY	
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO:155)	
J1 humana	TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:156)	

Ejemplo 2: Generación y ensayo de anticuerpos humanos compuestos

- 5 Los genes de la región VH y VK de anticuerpos humanos compuestos de variante 1 inicial se sintetizaron para EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 usando una serie de oligonucleótidos superpuestos que se hibridaron, se ligaron y se amplificaron por PCR para dar regiones V de longitud completa (figura 2A, figura 3A, figura 4A, figura 5A, figura 6A y figura 7A). Para cada anticuerpo humano compuesto, las variantes de secuencia posteriores se construyeron usando oligonucleótidos superpuestos largos y PCR, usando la variante 1 inicial como plantilla. A continuación, las variantes ensambladas se clonaron directamente en vectores de expresión (figura 1) y sus secuencias se verificaron.

- 10 Todas las combinaciones de cadenas pesadas y ligeras quiméricas y compuestas (es decir, un total de 20 emparejamientos para cada anticuerpo) se transfectaron de forma estable en células NS0 por electroporación y se seleccionaron en medios (DMEM con alto contenido de glucosa con L-glutamina y piruvato de Na, FCS de IgG ultra bajo al 5 %, pen/estrep. - todos de Invitrogen) que contenían metotrexato 200 nM. Se ensayaron varias colonias farmacorresistentes para cada construcción para determinar los niveles de expresión y las mejores líneas de expresión se seleccionaron y se congelaron en nitrógeno líquido.

- 20 Los sobrenadantes de las mejores líneas de expresión para cada combinación se cuantificaron usando una captura Fc, ELISA de detección de cadena ligera Kappa en comparación con un patrón IgG1/kappa. A continuación, los sobrenadantes cuantificados se ensayaron en un ELISA competitivo para determinar la unión a su antígeno diana. Se recubrieron placas de noventa y seis pozos Maxisorb™ (Nunc) durante la una noche a 4 °C con 50 µl/pocillos de 1 µg/ml de Fc-PD-1, Fc-PD-L1 o Fc-PD-L2 humano (R&D systems) en tampón carbonato a pH 9,6. Se generaron valoraciones duplicadas de muestras de anticuerpo de referencia de ratón y anticuerpo humano compuesto (en el intervalo de 0,0078 µg/ml a 8 µg/ml) y se mezclaron con una concentración constante (40 ng/ml) de anticuerpo de referencia de ratón biotinilado en PBS a pH 7,4/BSA al 2 %. Las valoraciones, 100 µl/pocillo, se añadieron a placas de ensayo lavadas (4 x con PBS a pH 7,4/Tween 20 al 0,05 %) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron como anteriormente y se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1/1000 de estreptavidina HRP (Sigma) en PBS a pH 7,4/BSA al 2 % y se incubaron durante 1 hora más a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, se detectó un anticuerpo de referencia biotinilado unido con 100 µl/pocillo de sustrato OPD. La absorbancia se midió a 490 nm, y las curvas de unión de los anticuerpos de prueba se compararon con el patrón de referencia de ratón. La absorbancia se representó gráficamente frente a la concentración de muestra y se ajustaron líneas rectas a través de cada uno de los conjuntos de datos. Las ecuaciones de las líneas se usaron para calcular la concentración requerida para inhibir la unión de biotina-EH12.2H7 a PD-1, unión de biotina-29E.2A3 a PD-L1 y la unión de biotina-24F.10C12 a PD-L2 humana al 50 % (CI₅₀).

Se seleccionaron los anticuerpos con la mejor CI₅₀ y las líneas celulares para todas estas variantes de anticuerpos

EH12.2H7, 29E.2A3 y 24F.10C12 se aumentaron de volumen hasta 100 ml y se cultivaron hasta la saturación. Los anticuerpos se purificaron a partir de cada cultivo a través de cromatografía de afinidad de proteína A. Brevemente, los sobrenadantes se ajustaron en pH con 0,1 volúmenes de 10 x PBS a pH 7,4 y pasaron sobre columnas de proteína A de 1 ml de mAb Select Sure (GE Healthcare). Las columnas se lavaron con 10 volúmenes de PBS a pH 7,4 antes de la elución con tampón citrato 50 mM a pH 3,0. Se recogieron 1 ml de fracciones y se neutralizaron inmediatamente con 0,1 ml de Tris-HCl 1 M a pH 9,0. Se agruparon las fracciones que contenían proteínas (según se determinó por la absorbancia a 280 nm), tampón se intercambió a PBS a pH 7,4 y los anticuerpos purificados se almacenaron a +4 °C. Las figuras 8A-8C muestran un gel SDS-PAGE de 1 µg de cada anticuerpo, teñido con azul Coomassie. Las concentraciones de los anticuerpos se calcularon mediante absorción UV basándose en coeficientes de extinción molar calculados de tal manera que $E_{0,1\%}$ a 280 nm = 1,61 para EH12.2H7, $E_{0,1\%}$ a 280 nm = 1,46 para 29E.2A3 y $E_{0,1\%}$ a 280 nm = 1,57 para 24F.10C12.

Los anticuerpos purificados se ensayaron para determinar la unión a Fc-PD-1, Fc-PD-L1 o Fc-PD-L2 humano a través de ELISA competitivo como se ha descrito anteriormente. Las valoraciones de los anticuerpos de prueba se realizaron de 0,0625 µg/ml a 8,0 µg/ml por duplicado. La absorbancia a 490 nm se midió y esta se representó gráficamente frente a la concentración de anticuerpos de prueba (figuras 9A-9C, 10A-10C).

La Tabla 4 resume los resultados para las combinaciones de las secuencias de variantes VH y VK compuestas para los anticuerpos anti PD-1, PD-L1 y PD-L2. Para EH12.2H7, todos los anticuerpos humanizados tienen una Cl_{50} que se mejora en comparación con la referencia de ratón, particularmente VH4/VK3 que tiene un aumento de dos veces en la unión. En el caso de 29E.2A3, las variantes VH2/VK1 y VH2/VK4 tienen una unión equivalente a la referencia de ratón, mientras que las variantes VH2/VK2 y VH4/VK2 tienen una unión reducida en 1,75 y 1,36 veces, respectivamente. Para 24F.10C12, todas las variantes seleccionadas tienen una unión similar, pero ligeramente reducida, en comparación con la referencia de ratón (1,13 veces).

Tabla 4: Valores de Cl_{50} para variantes de secuencia de anticuerpos humanos compuestos contra PD-1, PD-L1 y PD-L2

EH12.2H7		29E.2A3		24F.10C12	
Anticuerpo	Cl_{50} µg/ml	Anticuerpo	Cl_{50} µg/ml	Anticuerpo	Cl_{50} µg/ml
ratón	1,23	ratón	0,28	ratón	0,52
VH3/VK3	0,93	VH2/VK1	0,27	VH2/VK2	0,58
VH3/VK4	0,74	VH2/VK2	0,49	VH2/VK3	0,59
VH4/VK3	0,57	VH4/VK2	0,38	VH4/VK2	0,60
VH4/VK4	0,91	VH2/VK4	0,29	VH4/VK4	0,58

Como resultado de estos experimentos, se han construido anticuerpos humanos compuestos específicos para PD-1, PD-L1 y PD-L2 humanas a partir de segmentos de secuencias de aminoácidos procedentes completamente de regiones variables de anticuerpos humanos no relacionadas. Todas las regiones CDR y marco en las variantes de anticuerpos humanos compuestos comprendían más de un segmento de secuencia humana no relacionada (obtenida de la base de datos de secuencias humanas), y todos los anticuerpos humanos compuestos se diseñaron específicamente para evitar los epítomos de linfocitos T. Se seleccionaron inicialmente cuatro candidatos principales para la unión a PD-1, PD-L1 o PD-L2 humanas y, tras un análisis posterior, se demostró que tenían una unión de dos veces con el anticuerpo murino.

Ejemplo 5: Estimulación mejorada de la activación de linfocitos T mediante la inhibición de la interacción entre ligando de PD-1: PD

La vía de señalización de PD-1 inhibe las señales coestimuladoras moderadas de TCR/CD28, reduciéndose en primer lugar la producción de citocinas sin una disminución en la proliferación de linfocitos T. A medida que se debilitan las señales coestimuladoras de TCR/CD28, la vía de PD-1 domina, con una gran reducción en la producción de citocinas acompañada de una reducción en la proliferación. Por consiguiente, para confirmar que la inhibición de la vía de PD-1 mediante la inhibición de la interacción con PD-L1 o PD-L2 usando anticuerpos humanos compuestos de la invención mejora la activación de linfocitos T, se realizan reacciones de linfocitos mixtos (MLR, por sus siglas en inglés).

Las células dendríticas mieloides inmaduras se aíslan cultivando monocitos de sangre periférica humana en IL-4 y GM-CSF. La exposición de las células dendríticas inmaduras a un cóctel inflamatorio de IL-1β, TNF-α, IL-6 y PGE₂ provoca el desarrollo de células dendríticas maduras que funcionan como APC. Sin embargo, la adición de IL-10 a las citocinas inflamatorias administradas durante la fase de maduración da como resultado APC que también funcionan solo de 1/6 a 1/3.

Se realizan ensayos de activación de linfocitos T (MLR), usando células dendríticas tratadas con IL-10 como APC, en presencia de anticuerpos humanos compuestos con anticuerpos contra PD-1, PD-L1 y/o PD-L2 o de control. Se predice que la adición de mAb anti PD-1, anti PD-L1 y/o PD-L2 a cultivos de células dendríticas tratadas con IL-10 más linfocitos T alogénicos dará como resultado un aumento en la proliferación de linfocitos T y la expresión de citocinas, en comparación con cultivos tratados con IgG de control. Una combinación de anticuerpos anti PD-1 con anticuerpos anti PD-L1, anticuerpos anti PD-L2, también puede dar como resultado un aumento en la estimulación

mayor que el observado con cualquier anticuerpo solo.

Ejemplo 6: Inhibición de la vía de PD-1 en ratones infectados de manera crónica

5 Se usan ratones infectados con diversas cepas del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) para estudiar el efecto de la infección vírica crónica en la función de los linfocitos T CD8. La cepa Armstrong del LCMV provoca una infección aguda que se limpia en 8 días, dejando atrás una población de larga duración de linfocitos T CD8 de memoria altamente funcionales e inactivos. La cepa LCMV CI-13, por el contrario, establece una infección persistente en el hospedador, caracterizada por una viremia que dura hasta 3 meses.

10 Para confirmar que el bloqueo de la señalización de PD-1 restaura la función de los linfocitos T y mejora el control vírico durante la infección crónica por LCMV, la señalización de PD-1 se interrumpe durante la infección crónica por LCMV usando anticuerpos anti PD-1 humanos compuestos, anticuerpos anti PD-L1 y/o anticuerpos anti PD-L2 de la invención. Los anticuerpos se administran cada tercer día a ratones infectados con LCMV CI-13 desde el día 23 hasta el día 37 después de la infección. Se espera que en el día 37 haya varias veces más linfocitos T CD8 específicos del LCMV en ratones tratados en relación con los controles no tratados. También se espera que la inducción de la proliferación sea específica para los linfocitos T CD8 ya que y el número de linfocitos T CD4 en el bazo probablemente sea aproximadamente el mismo en ratones tratados y ratones no tratados.

20 Además de un aumento en la proliferación de linfocitos T CD8, se espera que la inhibición de la señalización de PD-1 también dé como resultado una mayor producción de citocinas antivíricas en los linfocitos T CD8 específicos de virus. La producción de IFN-gamma y TNF-alfa por los linfocitos T CD8 probablemente será varias veces mayor en ratones tratados en comparación con ratones no tratados. El aclaramiento vírico también debe acelerarse y se deben observar valores víricos reducidos en el pulmón y el riñón para el día 37 después de la infección en ratones tratados, mientras que los ratones no tratados probablemente mostrarán niveles significativos de virus en todos estos tejidos.

30 Los linfocitos T CD4 desempeñan una función clave en la generación y el mantenimiento de las respuestas de los linfocitos T CD8. A este respecto, los linfocitos T CD8 cebados en ausencia de linfocitos T CD4 son incapaces de crear respuestas inmunitarias normales y, por lo tanto, a menudo se les conoce como "linfocitos T indefensos". Además, la infección crónica por LCMV es más grave en ausencia de linfocitos T CD4. Por consiguiente, los linfocitos T indefensos generados durante la infección por LCMV-CI-13 muestran un deterioro funcional aún más profundo que los linfocitos T generados en presencia de linfocitos T CD4.

35 Los linfocitos T CD4 se agotan en el momento de la infección por LCMV-CI-13 y los ratones se tratan con anticuerpos anti PD-1 humanos compuestos, anticuerpos anti PD-L1 y/o anticuerpos anti PD-L2 de la presente invención del día 46 al día 60 después de la infección. Se espera que después del tratamiento, los ratones tratados probablemente tengan varias veces más linfocitos T CD8 específicos del LCMV en el bazo que los ratones de control no tratados. Este aumento en los linfocitos T CD8 específicos de virus en ratones tratados probablemente será el resultado de un aumento en la proliferación, según lo detectado por la incorporación de BrdU. El análisis BrdU se realiza introduciendo 40 1 mg/ml de BrdU en el agua durante el tratamiento y la tinción se realiza de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD Biosciences, San Diego, Calif.).

45 Para confirmar que la inhibición de las señales de PD-1 aumenta la actividad lítica de los linfocitos T CD8 específicos de virus, agotados, indefensos, la actividad lítica *ex vivo* de los linfocitos T CD8 específicos de virus se detecta después del tratamiento usando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Wherry *et al.*, 2003. J. Virol. 77:4911-27). Se espera que los valores víricos se reduzcan varias veces en el bazo, el hígado, el pulmón y el suero después de 2 semanas de tratamiento en relación con los ratones no tratados.

Ejemplo 7: Administración de una vacuna con un inhibidor de la señalización de PD-1

50 Un enfoque para aumentar las respuestas de los linfocitos T durante una infección persistente es la vacunación terapéutica. La justificación de este enfoque es que los antígenos endógenos pueden no presentarse de manera óptima o inmunogénica durante la infección vírica crónica y que proporcionar antígeno en forma de vacuna puede proporcionar un estímulo más eficaz para los linfocitos T y B específicos de virus. Usando el modelo de LCMV crónico, a los ratones se les administra un virus vaccinia recombinante que expresa el epítipo GP33 de LCMV como una vacuna terapéutica (WGP33), lo que da como resultado una modesta mejora de las respuestas de los linfocitos T CD8 en algunos ratones infectados de manera crónica. Esta vacunación terapéutica se combina con anticuerpos anti PD-1 humanos compuestos, anticuerpos anti PD-L1 y/o anticuerpos anti PD-L2 de la invención. Se espera que las respuestas de los linfocitos T específicos del LCMV aumenten a un nivel mayor que en comparación con cualquier tratamiento solo y que el efecto del tratamiento combinado probablemente sea más que aditivo.

Ejemplo 8: Chimpancés como modelo para la inmunoterapia de infección por VHC persistente.

65 Los chimpancés proporcionan un modelo de persistencia del VHC en seres humanos. Los defectos en la inmunidad de los linfocitos T que conducen a una persistencia del virus prolongada incluyen un déficit en los linfocitos T auxiliares CD4 específicos del VHC y el deterioro o alteración de la actividad de los linfocitos T CD8. Los chimpancés infectados

persistentemente se tratan con anticuerpos anti PD-1 humanos compuestos, anticuerpos anti PD-L1 y/o anticuerpos anti PD-L2 de la invención. Se determinan la eficacia del bloqueo de las vías inhibitorias, junto con la vacunación usando proteínas VHC estructurales y no estructurales recombinantes, y si tales estrategias pueden mejorar la frecuencia y la longevidad de los linfocitos T de memoria específicos de virus. El defecto en la inmunidad de los linfocitos T es exclusivamente específico del VHC en humanos y chimpancés infectados persistentemente. A continuación, la actividad antivírica puede restaurarse suministrando a los chimpancés anticuerpos monoclonales humanizados que bloquean la señalización a través de estas moléculas.

Los chimpancés infectados persistentemente se tratan con anticuerpos anti PD-1 humanos compuestos, anticuerpos anti PD-L1 y/o anticuerpos anti PD-L2 de la invención. Después del tratamiento con anticuerpos, se determinan las respuestas inmunitarias humorales y celulares, así como la carga de ARN del VHC. Las muestras se recogen en las semanas 1, 2, 3, 5 y 8 y, a continuación, a intervalos mensuales. Las muestras incluyen: 1) suero para el análisis de transaminasas, autoanticuerpos, anticuerpos neutralizantes contra el VHC y respuestas de citocinas, 2) plasma para la carga vírica y la evolución genómica, 3) PBMC para medidas *in vitro* de inmunidad, expresión y función de receptores costimulatorios/inhibidores, 4) hígado fresco (no fijado) para el aislamiento de linfocitos intrahepáticos y ARN, y 5) hígado fijado (formalina/incluido en parafina) para histología y análisis inmunohistoquímico. Los ganglios linfáticos regionales también se recogen en 2 o 3 puntos temporales para evaluar la expresión de las moléculas coinhibidoras y variantes de corte y empalme por técnicas de inmunohistoquímica y moleculares.

Para determinar si la vacunación con antígenos del VHC potencia el efecto terapéutico de los anticuerpos, los chimpancés se tratan de la siguiente manera: 1) inmunización intramuscular con glucoproteínas de envoltura recombinantes E1 y E2 (en adyuvante MF59) y otras proteínas (centrales más NS 3, 4 y 5 formuladas con ISCOMS) en las semanas 0, 4 y 24; 2) inmunización intramuscular con la vacuna usada en, pero administrada conjuntamente con anticuerpos anti PD-1 humanos compuestos, anticuerpos anti PD-L1 y/o anticuerpos anti PD-L2 de los anticuerpos de la invención. Las respuestas de los linfocitos T y B específicos del VHC se controlan a intervalos mensuales después de la inmunización durante un período de 1 año.

Los marcadores examinados en linfocitos T totales y positivos al tetrámero del VHC en este análisis incluyen marcadores de diferenciación (por ejemplo, CD45RA/RO, CD62L, CCR7 y CD27), activación (por ejemplo, CD25, CD69, CD38 y HLA-DR), supervivencia/proliferación (por ejemplo, bcl-2 y Ki67), potencial citotóxico (por ejemplo, granzimas y perforina) y receptores de citocinas (CD122 y CD127). Existe una correlación interesante entre los niveles previos a la terapia de la quimiocina IP-10 y la respuesta a PEG IFN-gamma/ribavirina. Los niveles de IP-10 se miden para investigar una posible correlación entre las vías reguladoras negativas o las respuestas de los linfocitos T específicos del VHC y los niveles de IP-10. La expresión de receptores inhibidores y ligandos en PBMC se realiza mediante citometría de flujo.

Ejemplo 9: Mejora de la inmunidad específica del VIS *in vivo* mediante el bloqueo de PD-1

El potencial de restauración inmunitaria del bloqueo de PD-1 durante la infección crónica del virus de inmunodeficiencia del simio (VIS) se ensayó en macacos. Se estudiaron catorce macacos rhesus indios (*Macaca mulatta*) infectados con el VIS. Se usaron ocho macacos para la fase crónica temprana y se infectaron por vía intravenosa con una dosis infecciosa de cultivo tisular del 200 50 % (TCID₅₀) de SIV251. Se usaron seis macacos para la fase crónica tardía, tres se infectaron por vía intrarrectal con SIV251 y tres se infectaron por vía intravenosa con SIV239. Todos los macacos, excepto RDb11, fueron negativos para los alelos Mamu B08 y Mamu B17. RDb11 fue positivo para el alelo Mamu B17.

Tratamiento con anticuerpos *in vivo*: A los macacos se les infundió anticuerpo anti PD-1 humano de ratón parcialmente humanizado (clon EH12-1540) (Dorfman *et al.*, Am. J. Surg. Pathol. 30:802-810, 2006) o un anticuerpo de control (SYNAGIS). El anticuerpo anti PD-1 tiene un dominio de cadena pesada variable de ratón unido a IgG1 humana (mutada para reducir la FcR y la unión del complemento) y un dominio de cadena ligera variable de ratón unido a κ humana. El clon EH12 se une a la PD-1 de macaco y bloquea las interacciones entre la PD-1 y sus ligandos *in vitro*. SYNAGIS es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado (IgG1 κ) específico de la proteína F del virus sincitial respiratorio. Los anticuerpos se administraron por vía intravenosa a razón de 3 mg kg⁻¹ de peso corporal los días 0, 3, 7 y 10.

Reacciones inmunitarias: Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de sangre y linfocitos de biopsias de función rectal como se ha descrito previamente (Velu *et al.*, J. Virol. 81:5819-5828, 2007). La tinción con tetrámero, la producción de citocinas intracelulares y las mediciones del anticuerpo de unión a Env anti VIS se realizaron como se ha descrito previamente (Amara *et al.*, Science 292:69-74, 2001; Kannanganat *et al.*, J. Virol. 81:8468-8476, 2007; Lai *et al.*, Virology 369:153-167, 2007).

El bloqueo de PD-1 se realizó durante las fases tempranas (10 semanas), así como las fases tardías (aproximadamente 90 semanas) de infección crónica por VIS. Nueve macacos (cinco durante la fase temprana y cuatro durante la fase tardía) recibieron el anticuerpo anti PD-1 y cinco macacos (tres durante la fase temprana y dos durante la fase tardía) recibieron un anticuerpo de control de isotipo (Synagis, específico del anti virus sincitial respiratorio (VSR)).

El bloqueo de PD-1 durante la infección crónica por VIS dio como resultado una rápida expansión de los linfocitos T CD8 específicos del VIS en la sangre de todos los macacos. Las respuestas de los linfocitos T CD8 a dos epítomos inmunodominantes, Gag CM9 (Allen *et al.*, J. Immunol. 160:6062-6071, 1998) y Tat SL8/TL8 (Allen *et al.*, Nature 407:386-390, 2000), se estudiaron usando complejos tetraméricos del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) I en siete de los macacos tratados con anticuerpo anti PD-1 y tres de los tratados con anticuerpo de control que expresaron la molécula de histocompatibilidad Mamu A*01. La mayor parte (>98 %) de los linfocitos T CD8 específicos del tetrámero Gag-CM9 expresaron PD-1 antes del bloqueo. Después del bloqueo de PD-1, los linfocitos T CD8 específicos del tetrámero Gag-CM9 se expandieron rápidamente y alcanzaron su punto máximo en 7-21 días. En la respuesta máxima, estos niveles fueron aproximadamente de 2,5 a 11 veces más altos que sus niveles respectivos el día 0 ($P = 0,007$) y permanecieron elevados hasta 28-45 días. Se observaron resultados similares con un bloqueo durante las fases tempranas así como tardías de la infección crónica por VIS. También se observó un aumento de 3-4 veces en la frecuencia de los linfocitos T CD8 positivos para interferón (IFN)- γ y específicos de Gag el día 14 después del bloqueo en los dos animales negativos para Mamu A*01 (RTd11 y RDb11), lo que demuestra que el bloqueo de PD-1 puede mejorar la frecuencia de los linfocitos T CD8 específicos de virus que están restringidos por los alelos no Mamu A*01. No se observó expansión de linfocitos T CD8 específicos del VIS en los macacos tratados con anticuerpos de control.

El bloqueo de PD-1 también se asoció con un aumento significativo en la frecuencia de los linfocitos T CD8 específicos de virus que se sometieron a división celular activa *in vivo* con una calidad funcional mejorada. De acuerdo con la rápida expansión de los linfocitos T CD8 específicos del VIS, la frecuencia de los linfocitos CD8 específicos del tetrámero Gag-CM9 que coexpresaron Ki67 (marcador para células proliferantes) también aumentó tan pronto como el día 7 después del bloqueo ($P = 0,01$). De manera similar, se observó un aumento en las frecuencias de los linfocitos T CD8 específicos del tetrámero Gag-CM9 que coexpresaban perforina y granzima B (potencial citolítico; $P = 0,001$ y $P = 0,03$, respectivamente), CD28 (potencial de coestimulación; $P = 0,001$), CD127 (potencial proliferativo; $P = 0,0003$) y CCR7 (potencial migratorio de los ganglios linfáticos; $P = 0,001$). Se observó un aumento transitorio de 1,5 a 2 veces en la frecuencia de los linfocitos T CD8 negativos para tetrámero y positivos para Ki67 después del bloqueo. Esto podría deberse a la expansión de los linfocitos T CD8 específicos a otros epítomos en Gag, así como otras proteínas del VIS, y otras infecciones víricas crónicas en estos animales. No se observó una mejora significativa para estos marcadores en los tres macacos tratados con anticuerpos de control.

No se observó expansión para los linfocitos T CD8 específicos de Tat-TL8 después del bloqueo. Esto podría deberse al escape vírico del reconocimiento por los linfocitos T CD8 específicos de Tat-TL8, ya que se sabe que el bloqueo de PD-1 da como resultado la expansión de los linfocitos T solo cuando reciben señales simultáneamente a través del receptor de linfocitos T. Para ensayar esta posibilidad, se secuenciaron los genomas víricos presentes en el plasma justo antes del inicio del bloqueo de los tres macacos positivos para Mamu A*01 que se infectaron con SIV251 y recibieron el anticuerpo de bloqueo durante la fase temprana de la infección. De hecho, se encontraron mutaciones en el genoma vírico correspondiente a la región del epítomo Tat TL8. Se ha demostrado o previsto que todas estas mutaciones reduzcan la unión del péptido Tat SL8/TL8 a la molécula MHC MAMU A*01 y den como resultado el escape del reconocimiento por los linfocitos T CD8 específicos de Tat-SL8/TL8". Estos resultados sugieren que el bloqueo de PD-1 *in vivo* puede no dar como resultado la expansión de los linfocitos T que son específicos del escape de mutantes de epítomos víricos.

El bloqueo de PD-1 también dio como resultado la expansión de los linfocitos T CD8 específicos de Gag-CM9 en el tejido mucoso colorrectal (intestino), un sitio preferencial de replicación del VIS/VIH. No se observó expansión para dos de los siete macacos, aunque la expansión fue evidente para uno de ellos en sangre. A diferencia de la sangre, la expansión en el intestino alcanzó su punto máximo mucho más tarde el día 42 y varió de 2 a 3 veces en comparación con sus respectivos niveles del día 0 ($P = 0,003$). Similar a la sangre, las células específicas del tetrámero Gag-CM9 que coexpresaron Ki67 ($P = 0,01$), perforina ($P = 0,03$), granzima B ($P = 0,01$) y CD28 ($P = 0,01$) también aumentaron en el intestino después del bloqueo.

Más importante aún, el bloqueo de PD-1 también mejoró la calidad funcional de los linfocitos T CD8 antivíricos y dio como resultado la generación de células polifuncionales capaces de producir conjuntamente las citocinas IFN- γ y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interleucina (IL)-2. El día del inicio del bloqueo de PD-1 durante la fase crónica tardía de la infección, la frecuencia de las células positivas para IFN- γ específicas de Gag fue baja y no pudieron expresar conjuntamente TNF- α e IL-2. Sin embargo, después del bloqueo, la frecuencia de las células positivas para IFN- γ aumentó en los cuatro macacos tratados con anticuerpos contra PD-1 ($P = 0,03$) y adquirieron la capacidad de expresar conjuntamente TNF- α e IL-2. La expansión de las células positivas para IFN- γ alcanzó su punto máximo en 14-21 días y los niveles máximos fueron 2-10 veces más altos que los niveles respectivos del día 0. El día 21, aproximadamente el 16 % de los linfocitos específicos de Gag totales expresaron conjuntamente las tres citocinas, y aproximadamente el 30 % expresó conjuntamente IFN- γ y TNF- α . Esto contrasta con <1 % del total de células específicas de Gag que expresan conjuntamente las tres citocinas ($P = 0,01$), y aproximadamente el 14 % que expresa conjuntamente IFN- γ y TNF- α el día 0 ($P = 0,04$). También se observaron resultados similares después del bloqueo durante la fase crónica temprana de la infección.

Para ensayar el papel de PD-1 en la regulación de la función de los linfocitos B durante las infecciones crónicas por

virus de inmunodeficiencia, se caracterizaron las respuestas de los linfocitos B después del bloqueo de PD-1 en macacos infectados por el VIS. El análisis de la expresión de PD-1 en diferentes subconjuntos de linfocitos B antes del bloqueo de PD-1 reveló la expresión preferencial de PD-1 por los linfocitos B de memoria (CD20⁺CD27⁺CD21⁻) en comparación con los linfocitos B sin tratar (CD20⁺CD27⁻CD21⁺; $P < 0,001$). El bloqueo de PD-1 *in vivo* dio como resultado un aumento de 2 a 8 veces en el valor del anticuerpo de unión específico del VIS el día 28 después del bloqueo ($P < 0,001$). Para comprender esto más a fondo, se realizaron experimentos en la proliferación de linfocitos B de memoria en macacos infectados con VIS que se trataron simultáneamente con anticuerpo anti PD-1 y terapia antirretrovírica y se observó un aumento significativo en los linfocitos B de memoria Ki67⁺ (proliferantes), pero no sin tratar, tan pronto como el día 3. Estos resultados demuestran que la vía de PD-1-PDL podría tener una función en la regulación de la disfunción de los linfocitos B durante una infección crónica con VIS.

Los ensayos de neutralización revelaron un aumento de dos veces en los valores frente al SIV251 adaptado al laboratorio fácilmente neutralizable y no hay un aumento en los valores frente a SIV251 o SIV239 de tipo natural difícil de neutralizar. En dos de los nueve animales tratados con anticuerpo anti PD-1, solo una expansión mínima (<2 veces) del anticuerpo específico del VIS después del bloqueo. Cabe de destacar que la frecuencia de los linfocitos B de memoria totales en estos dos animales fue menor (-40 % de los linfocitos B totales) en comparación con los siete animales restantes (60-90 % de los linfocitos B totales) antes del bloqueo, lo que indica que el nivel de linfocitos B de memoria específicos del VIS antes del bloqueo puede determinar el nivel de expansión del anticuerpo específico del VIS después del bloqueo.

El bloqueo de PD-1 dio como resultado reducciones significativas en la viremia plasmática ($P = 0,03$) y también prolongó la supervivencia de los macacos infectados con SW ($P = 0,001$). En dos de los cinco macacos tratados con anticuerpo anti PD-1 durante la fase crónica temprana, la carga vírica disminuyó el día 10 y persistió en este nivel o por debajo hasta el día 90. En un macaco, la carga vírica disminuyó de manera transitoria y en los dos macacos restantes aumentó transitoriamente y volvió a los niveles previos al bloqueo. A diferencia de la fase crónica temprana, los cuatro macacos tratados con el anticuerpo anti PD-1 durante la fase crónica tardía mostraron un aumento transitorio de la viremia el día 7, pero se redujo rápidamente la carga vírica el día 21 a niveles que estaban por debajo de sus respectivos niveles del día 0. Sin embargo, los niveles de ARN vírico volvieron a los niveles previos al bloqueo el día 43. Como era de esperar, no se observaron reducciones significativas en las cargas víricas plasmáticas en ninguno de los cinco macacos tratados con el anticuerpo de control. En 21-28 días después del bloqueo, los niveles de ARN vírico en los animales tratados con anticuerpo anti PD-1 fueron 2-10 veces más bajos que sus respectivos niveles del día 0 ($P = 0,03$). Para el día 150 después del bloqueo, cuatro de los cinco macacos en el grupo de control se sacrificaron debido a síntomas relacionados con el SIDA (por ejemplo, pérdida de apetito, diarrea, pérdida de peso), mientras que los nueve animales del grupo tratado con anticuerpo anti PD-1 sobrevivieron ($P = 0,001$).

El aumento inicial observado en los niveles de viremia plasmática en todos los animales tratados en la fase tardía y algunos de los animales tratados en la fase temprana podría deberse a un aumento en la frecuencia de los linfocitos T CD4 activados. Para determinar esto, se midieron el porcentaje de linfocitos T CD4 totales positivos para Ki67, así como la frecuencia de los linfocitos T CD4 productores de IFN- γ específicos del VIS (dianas preferenciales para la replicación vírica) después del bloqueo. Estos análisis revelaron un aumento transitorio en el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos para Ki67 los días 7-14 después del bloqueo ($P = 0,002$) y este aumento fue mayor en los animales tratados durante la fase tardía que en la fase temprana de la infección ($P = 0,015$). De manera similar, también se observó un aumento en la frecuencia de los linfocitos T CD4 específicos de Gag, pero solo en animales tratados durante la fase tardía de la infección. No se observaron aumentos significativos para estos linfocitos T CD4 activados en los macacos tratados con anticuerpos de control. Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD4 activados podrían haber contribuido al aumento inicial observado en los niveles de viremia plasmática después del bloqueo.

Antes del inicio del bloqueo de PD-1, la carga vírica del punto de ajuste en los linfocitos T CD4 en plasma y totales en la sangre y el intestino fue similar entre los grupos tratados con anticuerpo anti PD-1 y tratados con anticuerpo de control. Sin embargo, las frecuencias de las células Gag CM9⁺ y las células Gag CM9⁺ que expresan conjuntamente perforina, granzima B o CD28 no fueron similares entre los dos grupos de tratamiento antes del bloqueo *in vivo*. Esto plantea la posibilidad de que estas diferencias puedan haber contribuido a la expansión de las células Gag CM9⁺ después del bloqueo de PD-1. Para estudiar la influencia de la frecuencia de las células Gag CM9⁺ antes del bloqueo en su expansión después del bloqueo, el grupo tratado con anticuerpo anti PD-1 se dividió en dos subgrupos basándose en la frecuencia de las células Gag CM9⁺ antes del inicio del bloqueo de tal forma que un grupo tiene niveles similares y el otro grupo tiene niveles más altos de células Gag CM9⁺ en comparación con el grupo tratado con anticuerpo de control. A continuación, estos subgrupos se analizaron para determinar la expansión de las células Gag CM9⁺ después del bloqueo. La expansión de las células Gag CM9⁺ fue evidente en ambos subgrupos de animales después del bloqueo de PD-1, independientemente de si estaban en niveles bajos o altos antes del bloqueo. También se observaron resultados similares con análisis de subgrupos basados en la frecuencia de las células Gag CM9⁺ que expresaban conjuntamente moléculas asociadas con una mejor función de los linfocitos T tales como perforina, granzima B, CCR7, CD 127 o CD28. Sin embargo, se observó una tendencia hacia una mejor expansión de las células Gag CM9⁺CD28⁺ en animales con niveles más altos de células Gag CM9⁺CD28⁺ antes del bloqueo, lo que sugiere que la expresión de CD28 puede servir como un biomarcador para predecir el resultado del bloqueo de PD-1 *in vivo*.

Los experimentos descritos anteriormente demuestran que el bloqueo de PD-1 usando un anticuerpo contra PD-1 da como resultado una rápida expansión de los linfocitos T CD8 específicos de virus con una calidad funcional mejorada. Esta inmunidad mejorada de los linfocitos T se observó en la sangre y también en el intestino, un importante reservorio de infección por VIS. El bloqueo de PD-1 también dio como resultado la proliferación de linfocitos B de memoria y aumentos en los anticuerpos específicos de la envoltura del VIS. Estas respuestas inmunitarias mejoradas se asociaron con reducciones significativas en la carga viral plasmática y también prolongaron la supervivencia de los macacos infectados con VIS. El bloqueo fue eficaz durante las fases temprana (semana 10) y tardía (~semana 90) de la infección crónica, incluso en condiciones de linfopenia grave. Estos resultados demuestran una mejora de las respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales durante una infección patógena por el virus de la inmunodeficiencia al bloquear una única vía inhibidora e identifican un enfoque terapéutico novedoso para el control de las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana.

Ejemplo 10: Proliferación mejorada de linfocitos T CD8 específicos del VIS después del bloqueo *in vitro* de la vía PD-1: PDL por un anticuerpo PD-1 humanizado y un anticuerpo PD-L1 humanizado

Se ensayó *in vitro* el efecto de un anticuerpo anti PD-1 humanizado procedente de EH-12.2H7 y un anticuerpo anti PD-L1 humanizado procedente de 29E.2A3 sobre la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD8 específicos de Gag del VIS. El anticuerpo anti PD-1 humanizado tiene la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:28 y la secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:32. El anticuerpo anti PD-L1 humanizado tiene la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:35 y la secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:42. La región constante de cadena pesada de los anticuerpos humanizados es de IgG4 humana con mutación de Ser 228 a Pro (de CPSCP a CPPCP) de manera que el anticuerpo forma dímeros y la región constante de cadena ligera es la región constante de cadena ligera kappa humana. La numeración de aminoácidos para Ser 228 es de acuerdo con el sistema de numeración EU. Véase Aalberse *et al.*, Immunology 105:9-19, 2002. Se tiñeron PBMC obtenidas de macacos infectados con el VIS (entre 3 meses y 1,5 años después de la infección) con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) y se estimularon con un grupo de péptidos Gag del VIS o medio de cultivo durante 6 días en presencia o ausencia de un anticuerpo bloqueante. Al final de la estimulación, las células se tiñeron para detectar CD3 y CD8 en la superficie y Ki-67 intracelular. A continuación, las células se adquirieron en un FACS Calibur y se analizaron usando el programa informático FlowJo. Los linfocitos se identificaron en función de la dispersión, a continuación se analizaron los linfocitos T CD8 (CD3+, CD8+) para determinar la tinción conjunta para Ki-67 y CFSE. Se identificaron células Ki-67+ con bajo contenido de CFSE como células en proliferación.

Como se muestra en la figura 14A, el bloqueo *in vitro* de la vía ligando de PD-1: PD-1 usando los Ab anti PD-1 produce un aumento significativo en la proliferación de respuestas de linfocitos T CD8 específicos del VIS. El bloqueo *in vitro* usando el Ab anti PD-L1 produce un aumento moderado en la proliferación de respuestas de linfocitos T CD8 específicos del VIS (figura 14B).

Ejemplo 11: Restauración de la proliferación de linfocitos T específicos del VHC mediante células mononucleares intrahepáticas de un chimpancé persistentemente infectado

Se aislaron linfocitos intrahepáticos marcados con CFSE (2×10^6) del chimpancé 1564 que se había infectado de manera crónica con la cepa H77 de genotipo 1a del VHC durante más de 10 años. Los linfocitos intrahepáticos se cultivaron conjuntamente durante 6 días con 4×10^6 PBMC con CD8 agotado, autólogas irradiadas que no se manipularon ni se impulsaron con péptidos superpuestos que abarcaban toda la poliproteína del VHC (cepa H77 de genotipo 1a). Las células se cultivaron en medio RPMI complementado con L-glutamina y FCS al 10 %, con y sin un anticuerpo bloqueante anti PD-L1 (10 µg/ml, añadido el día 0 y día 2). El anticuerpo anti PD-L1 humanizado tiene la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:35 y la secuencia de región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:42. La región constante de cadena pesada de los anticuerpos humanizados es de IgG4 humana con mutación de Ser 228 a Pro (de CPSCP a CPPCP) de manera que el anticuerpo forma dímeros y la región constante de cadena ligera es la región constante de cadena ligera kappa humana. La numeración de aminoácidos para Ser 228 es de acuerdo con el sistema de numeración EU. Véase Aalberse *et al.*, Immunology 105:9-19, 2002. El día 6, las células se tiñeron con CD8-PerCP, tetrámero A0701/P7(758)-PE, PD-1-Alexa 647, CD4-Alexa 700, CD14-Alexa 700, CD16-Alexa 700, CD19-Alexa 700 y colorante azul Live/Dead. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo BD LSR II y los datos se analizaron usando el programa informático FlowJo.

Como se muestra en la figura 15, el tratamiento con el anticuerpo anti PD-L1 reestableció la proliferación de linfocitos T específicos del VHC mediante células mononucleares intrahepáticas de un chimpancé persistentemente infectado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humano compuesto o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso terapéutico para regular positivamente una respuesta inmunitaria en un sujeto, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo:
 - comprende: a) una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34-38 y b) una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 39-42;
 - 10 se une a una proteína PD-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
 - 15 a) una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 35 o 37; y
 - b) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 39, 40 o 42.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la unión del anticuerpo 29E2A3 a Fc-PD-L1,
 - 20 en donde el anticuerpo 29E2A3 comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 78, y una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 79.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe una señal mediada por PD-L1.
 - 25 5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la regulación positiva de la respuesta inmunitaria comprende mejorar una respuesta inmunitaria existente.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la regulación positiva de la respuesta inmunitaria comprende provocar una respuesta inmunitaria inicial.
 - 30 7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el sujeto es un paciente infectado.
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el sujeto padece una infección microbiana.
 - 35 9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 8, en donde la infección microbiana se selecciona del grupo que consiste infección bacteriana, infección vírica e infección parasitaria.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el sujeto padece una enfermedad vírica de la piel.
 - 40 11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 10, en donde la enfermedad vírica de la piel es herpes o culebrilla.
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el sujeto padece una enfermedad vírica sistémica.
 - 50 13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 12, en donde la enfermedad vírica sistémica se selecciona del grupo que consiste en gripe, resfriado común y encefalitis.
14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la regulación positiva de la respuesta inmunitaria comprende inducir inmunidad a un patógeno.
 - 55 15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la regulación positiva de la respuesta inmunitaria comprende superar la tolerancia preexistente a un antígeno autólogo, preferentemente un antígeno específico de tumor.
16. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que se usa eliminando células inmunitarias del sujeto, poniendo en contacto las células inmunitarias *in vitro* con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, e introduciendo de nuevo las células inmunitarias estimuladas *in vitro* en el sujeto.
 - 60 17. Un anticuerpo humano compuesto o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso terapéutico para regular positivamente una respuesta inmunitaria en un sujeto:

- eliminando las células inmunitarias del sujeto,
poniendo en contacto las células inmunitarias *in vitro* con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo,
e
5 introduciendo las células inmunitarias estimuladas *in vitro* en el sujeto,
- en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo
- 10 comprende a) una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las
SEQ ID NO: 34-38 y b) una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en
las SEQ ID NO: 39-42;
se une a una proteína PD-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4.
- 15 18. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de la reivindicación 17, en donde el sujeto
es un paciente infectado.

Figura 1. Diagramas de vectores de expresión

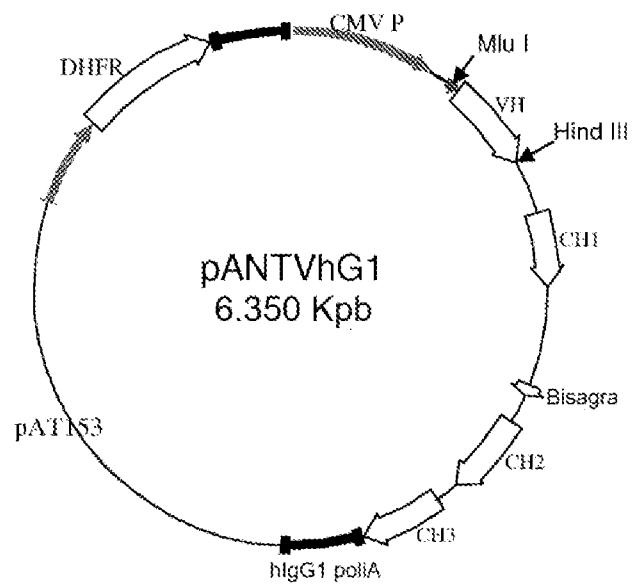
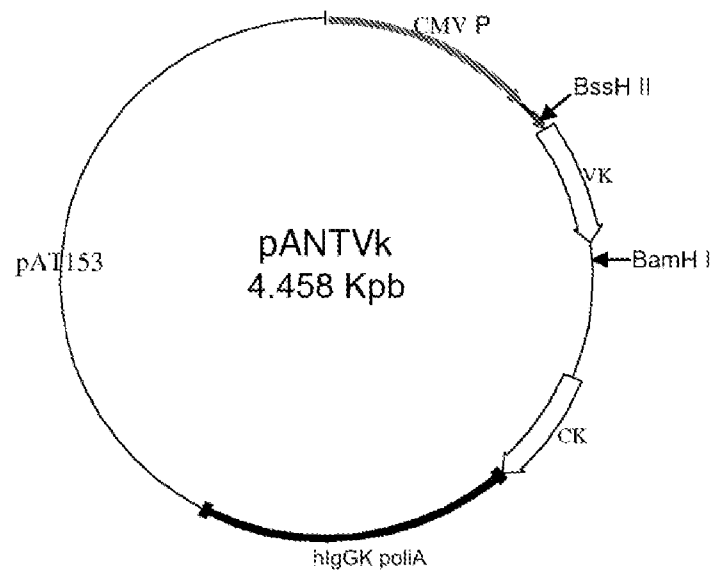


Figura 2. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos compuestos de cadenas pesadas anti PD-1
(Figura 2A) Cadena pesada VH1

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAACTCAAACAGCCTGGGGCCTC
Q V Q L V Q S G A E L K Q P G A S

      60      70      80      90     100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
V K M S C K A S G Y S F T S S W
                               CDR1

     110     120     130     140     150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGCTCTGGAATGGATTGGATAC
I H W V K Q A P G Q G L E W I G Y

     160     170     180     190     200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I Y P S T G F T E Y N Q K F K D R
                               CDR2

     210     220     230     240     250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
A T L T A D K S T S T A Y M E L

     260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S S L R S E D S A V Y Y C A R W R

     310     320     330     340     350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
D S S G Y H A M D Y W G Q G T S V
                               CDR3

     360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:1)
T V S S (SEQ ID NO:25)

```

(Figura 2B) Cadena pesada VH2

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  Q  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                   CDR1

      110     120     130     140     150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                   CDR2

      210     220     230     240     250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

      310     320     330     340     350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  S  V
                                   CDR3

      360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:3)
  T  V  S  S  (SEQ ID NO:26)

```

(Figura 2C) Cadena pesada VH3

10 20 30 40 50
 CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q V Q L V Q S G H E V K Q P G A S

60 70 80 90 100
 AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
 V K M S C K A S G Y S F T S S W
 CDR1

110 120 130 140 150
 TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I H W V K Q A P G Q G L E W I G Y

160 170 180 190 200
 ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGCACAG
I Y P S T G F T E Y N Q K F K D R
 CDR2

210 220 230 240 250
 GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
 A T L T A D K S T S T A Y M E L

260 270 280 290 300
 GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
 S S L R S E D T A V Y Y C A R W R

310 320 330 340 350
 GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGT
D S S G Y H A M D Y W G Q G T L V
 CDR3

360
 CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)
 T V S S (SEQ ID NO:27)

(Figura 2D) Cadena pesada VH4

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCATGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                   CDR1

      110     120     130     140     150
TACACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGCACAG
I  Y  F  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                   CDR2

      210     220     230     240     250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

      310     320     330     340     350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGST
D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
                                   CDR3

      360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:52)
  T  V  S  S  (SEQ ID NO:28)

```

(Figura 2E) Cadena pesada VH5

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCATGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

      60      70      80      90     100
AGTGAAGGTGTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                   CDR1

     110     120     130     140     150
TACACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

     160     170     180     190     200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGASTACAATCAGAAAGTTCAAGGACAG
  I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                   CDR2

     210     220     230     240     250
GGCCACAATCACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  A  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

     260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

     310     320     330     340     350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTGGT
  D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
                                   CDR3

     360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:53)
  T  V  S  S  (SEQ ID NO:29)

```

Figura 3. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos compuestos de cadenas ligeras anti PD-1**(Figura 3A) Cadena ligera VK1**

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAACTCTGTCTCCAGGGCA
D I V L T Q S P A S L T L S P G Q

      60      70      80      90     100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTGAGTACATCTGGCT
R L T I S C R A S Q S V S T S G
              CDR1

      110     120     130     140     150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACCTC
Y S Y M H W Y Q Q K P D Q S P K L

      160     170     180     190     200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTTCAG
L I K F G S N L E S G I P A R F S
              CDR2

      210     220     230     240     250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGG
G S G S G T D F T L T I S S L E

      260     270     280     290     300
AGGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
E E D F A T Y Y C Q H S W E I P Y
                      CDR3

      310     320     330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:54)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:30)

```

(Figura 3B) Cadena ligera VK2

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
  D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

      60      70      80      90      100
GAGGCTCACCATCTCATGCGAGGGCCAGCCAAAGTGTGAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                        CDR1

      110     120     130     140     150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACCTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

      160     170     180     190     200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTTCAG
  L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
                        CDR2

      210     220     230     240     250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

      260     270     280     290     300
CTGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                        CDR3

      310     320     330
ACGTTCCGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:55)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K (SEQ ID NO:31)

```

(Figura 3C) Cadena ligera VK3

```

      10      20      30      40      50
GAGATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
  E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

      60      70      80      90     100
GAGGCTCACCATCTCATGCGAGGGCCAGCCAAAGTGTGAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                        CDR1

     110     120     130     140     150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACCTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

     160     170     180     190     200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTTCAG
  L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
                CDR2

     210     220     230     240     250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

     260     270     280     290     300
CTGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                        CDR3

     310     320     330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:56)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K (SEQ ID NO:32)

```

(Figura 3D) Cadena ligera VK4

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
D I V L T Q S P A T L S L S P G Q

      60      70      80      90     100
GAGGCTCACCATCTCATGCGAGGGCCAGCCAAAGTGTGAGTACATCTGGCT
R L T I S C R A S Q S V S T S G
                      CDR1

     110     120     130     140     150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACCTC
Y S Y M H W Y Q Q K P D Q S P K L

     160     170     180     190     200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTTCAG
L I K F G S N L E S G I P A R F S
                      CDR2

     210     220     230     240     250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
G S G S G T D F T L T I S S L E

     260     270     280     290     300
CTGAGGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P E D F A V Y Y C Q H S W E I P Y
                      CDR3

     310     320     330
ACGTTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:57)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:33)

```

Figura 4. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos compuestos de cadenas pesadas anti PD-L1**(Figura 4A) Cadena pesada VH1**

10 20 30 40 50
 GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E V Q L V Q S G P E L K K P G A S

60 70 80 90 100
 AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGCTATGTTA
 V K M S C K A S G Y T F T S Y V
 CDR1

110 120 130 140 150
 TGCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M H W V K Q A P G Q R L E W I G Y

160 170 180 190 200
 GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
V N P F N D G T K Y N E M F K G R
 CDR2

210 220 230 240 250
 GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
 A T L T S D K S T S T A Y M E L

260 270 280 290 300
 GCAGCCTGAGGTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
 S S L R S E D S A V Y Y C A R Q A

310 320 330 340
 TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:58)
W G Y P W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:34)
 CDR3

(Figura 4B) Cadena pesada VH2

```

      10      20      30      40      50
GAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S

      60      70      80      90     100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGCTATGTTA
V K M S C K A S G Y T F T S Y V
                                   CDR1

     110     120     130     140     150
TGCACTGGGTGAAGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M H W V K Q A P G Q R L E W I G Y

     160     170     180     190     200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
V N P F N D G T K Y N E M F K G R
                        CDR2

     210     220     230     240     250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
A T L T S D K S T S T A Y M E L

     260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGGICTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S S L R S E D T A V Y Y C A R Q A

     310     320     330     340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:59)
W G Y P W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:35)
CDR3

```

(Figura 4C) Cadena pesada VH3

10 20 30 40 50
 GAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E V Q L V Q S G A E V K K P G A S

60 70 80 90 100
 AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGCTATGTTA
 V K M S C K A S G Y T F T S Y V
 CDR1

110 120 130 140 150
 TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M H W V R Q A P G Q R L E W I G Y

160 170 180 190 200
 GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V N P F N D G T K Y N E M F K G R
 CDR2

210 220 230 240 250
 GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
 A T L T S D K S T S T A Y M E L

260 270 280 290 300
 GCAGCCTGAGGCTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
 S S L R S E D T A V Y Y C A R Q A

310 320 330 340
 TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:60)
W G Y P W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:36)
 CDR3

(Figura 4D) Cadena pesada VH4

10 20 30 40 50
 GAGGTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E V Q L V Q S G A E V K K P G A S

60 70 80 90 100
 AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGCTATGTTA
 V K V S C K A S G Y T F T S Y V
 CDR1

110 120 130 140 150
 TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M H W V R Q A P G Q R L E W I G Y

160 170 180 190 200
 GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V N P F N D G T K Y N E M F K G R
 CDR2

210 220 230 240 250
 GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
 A T L T S D K S T S T A Y M E L

260 270 280 290 300
 GCAGCCTGAGGICTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
 S S L R S E D T A V Y Y C A R Q A

310 320 330 340
 TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:61)
W G Y P W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:37)
 CDR3

(Figura 4E) Cadena pesada VH5

```

      10      20      30      40      50
GAGGTC CAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S

      60      70      80      90     100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGCTATGTTA
V K V S C K A S G Y T F T S Y V
                                CDR1

     110     120     130     140     150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M H W V R Q A P G Q R L E W I G Y

     160     170     180     190     200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
V N P F N D G T K Y N E M F K G R
                                CDR2

     210     220     230     240     250
GGCCACAATCACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
A T I T S D K S T S T A Y M E L

     260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGGICTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S S L R S E D T A V Y Y C A R Q A

     310     320     330     340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:62)
W G Y P W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO:38)
CDR3

```

Figura 5. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos compuestos de cadenas ligeras anti PD-L1**(Figura 5A) Cadena ligera VK1**

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTCTGTCTCCCGGGGA
D I V L T Q S P A S L A L S P G E

      60      70      80      90     100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTGGAATACTATGGCA
R A T L S C R A T E S V E Y Y G
                      CDR1

     110     120     130     140     150
CAAGTTTtagtgcagtggtaccAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T S L V Q W Y Q Q K P G Q P P K L

     160     170     180     190     200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
L I Y A A S S V D S G V P S R F S
                      CDR2

     210     220     230     240     250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
G S G S G T D F T L T I N S L E

     260     270     280     290     300
AGGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
E E D A A M Y F C Q Q S R R V P Y
                      CDR3

     310     320     330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:63)
I F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:39)

```

(Figura 5B) Cadena ligera VK2

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
  D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E

      60      70      80      90     100
GAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                        CDR1

     110     120     130     140     150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

     160     170     180     190     200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
  L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
                        CDR2

     210     220     230     240     250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

     260     270     280     290     300
CCGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
  A  E  D  A  A  M  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                        CDR3

     310     320     330
ACGTTCCGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:64)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K (SEQ ID NO:40)

```

(Figura 5C) Cadena ligera VK3

10 20 30 40 50
 GAGATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
 E I V L T Q S P A T L S L S P G E

60 70 80 90 100
 GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
 R A T L S C R A T E S V E Y Y G
 CDR1

110 120 130 140 150
 CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T S L V Q W Y Q Q K P G Q P P K L

160 170 180 190 200
 CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L I Y A A S S V D S G V P S R F S
 CDR2

210 220 230 240 250
 TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
 G S G S G T D F T L T I N S L E

260 270 280 290 300
 CCGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
 A E D A A M Y F C Q Q S R R V P Y
 CDR3

310 320 330
 ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:65)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:41)

(Figura 5D) Cadena ligera VK4

10 20 30 40 50
 GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
 D I V L T Q S P A T L S L S P G E

60 70 80 90 100
 GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
 R A T L S C R A T E S V E Y Y G
 CDR1

110 120 130 140 150
 CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T S L V Q W Y Q Q K P G Q P P K L

160 170 180 190 200
 CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L I Y A A S S V D S G V P S R F S
 CDR2

210 220 230 240 250
 TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
 G S G S G T D F T L T I N S L E

260 270 280 290 300
 CCGAGGATGCTGCAACCTATTTCTGTTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
 A E D A A T Y F C Q Q S R R V P Y
 CDR3

310 320 330
 ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:66)
T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:42)

Figura 6. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos compuestos de cadenas pesadas anti PD-L2
(Figura 6A) Cadena pesada VH1

```

      10      20      30      40      50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAACTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  L  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90     100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                           CDR1

     110     120     130     140     150
TGCACTGGGTAAAACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

     160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAACTGGATATACTGAGTATAATCAGAAAGTTCAAGGACAG
I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                CDR2

     210     220     230     240     250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAAGTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

     260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S  S  L  R  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

     310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:67)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:43)
CDR3

```

(Figura 6B) Cadena pesada VH2

```

      10      20      30      40      50
CAGSTCCAGCTGGTIGCASTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  I
                                           CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACCTGGGTAAAAACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                               CDR2

      210     220     230     240     250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

      310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:68)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:44)
    CDR3

```

(Figura 6C) Cadena pesada VH3

```

      10      20      30      40      50
CAGSTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGATGTCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  I
                                           CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACITGGGTAAAGACAGGCCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                               CDR2

      210     220     230     240     250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

      310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:69)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:45)
    CDR3

```

(Figura 6D) Cadena pesada VH4

```

      10      20      30      40      50
CAGSTCCAGCTGGTIGCASTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGGTGTCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  I
                                   CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTAAAGACAGGCCCTGGACAGGSTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
  I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                                   CDR2

      210     220     230     240     250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCASCTEGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
  S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

      310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:70)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:46)
      CDR3

```

(Figura 6E) Cadena pesada VH5

```

      10      20      30      40      50
CAGSTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
  Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

      60      70      80      90      100
AGTGAAGGIGTCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  I
                                           CDR1

      110     120     130     140     150
TGCACTGGGTAAAGACAGGCCCTGGACAGGCTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160     170     180     190     200
ATTAATCCTAGAAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                        CDR2

      210     220     230     240     250
GACCACAATCACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

      260     270     280     290     300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

      310     320     330     340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:71)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S (SEQ ID NO:47)
CDR3

```

Figura 7. Variantes de secuencias de anticuerpos humanos compuestos de cadenas ligeras anti PD-L2
(Figura 7A) Cadena ligera VK1

10	20	30	40	50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGACTGTGACACCAGGAGA				
D	I	V	M	T
Q	S	P	A	S
L	T	V	T	P
G	E			

60	70	80	90	100
GAAGGTCACCTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA				
K	V	T	I	T
C	K	S	S	Q
S	L	L	N	S
G				

CDR1

110	120	130	140	150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT				
N	Q	K	N	Y
L	T	W	Y	Q
Q	Q	K	P	G
Q	P	P		

160	170	180	190	200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG				
K	L	L	I	Y
W	A	S	T	R
E	S	G	V	P
D	R			

CDR2

210	220	230	240	250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC				
F	T	G	S	G
S	G	T	D	F
T	L	T	I	S
S				

260	270	280	290	300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT				
L	Q	A	E	D
V	A	V	Y	Y
C	Q	N	D	Y
S	Y			

CDR3

310	320	330
CCTCTCACGITCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:72)		
P	L	T
F	G	Q
G	T	K
L	E	I
K		

(SEQ ID NO:48)

(Figura 7B) Cadena ligera VK2

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
D I V M T Q S P A S L S V T P G E

      60      70      80      90     100
GAAGGTCACCTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAA
K V T I T C K S S Q S L L N S G
                      CDR1

     110     120     130     140     150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N Q K N Y L T W Y Q Q K P G Q P P

     160     170     180     190     200
AAACTGTTGATCTACTGSGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
K L L I Y W A S T R E S G V P D R
                      CDR2

     210     220     230     240     250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
F T G S G S G T D F T L T I S S

     260     270     280     290     300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L Q A E D V A V Y Y C Q N D Y S Y
                      CDR3

     310     320     330
CCTCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:73)
P L T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:49)

```

(Figura 7C) Cadena ligera VK3

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTTCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
  D  I  V  M  T  Q  S  P  A  F  L  S  V  T  P  G  E

      60      70      80      90     100
GAAGGTCACCTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                        CDR1

     110     120     130     140     150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

     160     170     180     190     200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
  K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                        CDR2

     210     220     230     240     250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

     260     270     280     290     300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
  L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                        CDR3

     310     320     330
CCTCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:74)
P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K (SEQ ID NO:50)

```

(Figura 7D) Cadena ligera VK4

```

      10      20      30      40      50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTTCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
  D  I  V  M  T  Q  S  P  A  F  L  S  V  T  P  G  E

      60      70      80      90     100
GAAGGTCACCTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                        CDR1

     110     120     130     140     150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

     160     170     180     190     200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
  K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                        CDR2

     210     220     230     240     250
CTTCTCCGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

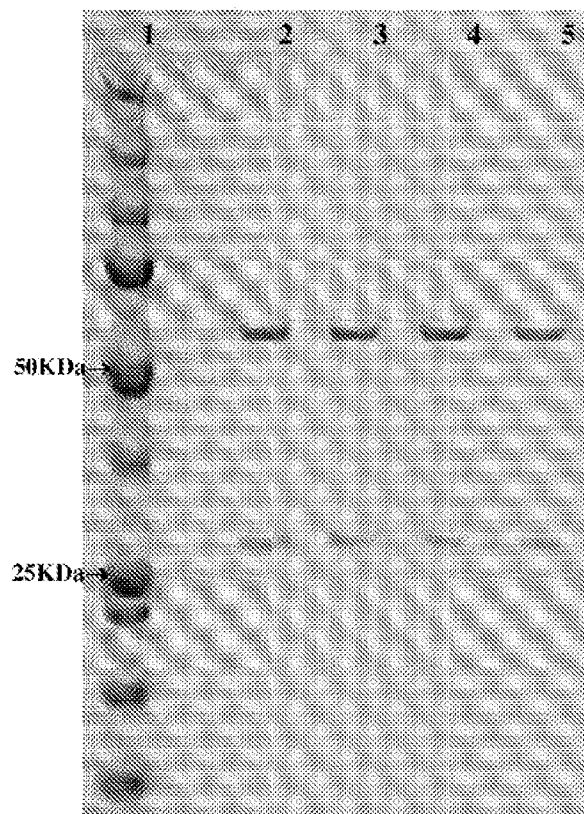
     260     270     280     290     300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGITTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
  L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                        CDR3

     310     320     330
CCTCTCACGTTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:75)
P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K (SEQ ID NO:51)

```

Figura 8. Purificación de anticuerpos humanos compuestos EH12.2H7

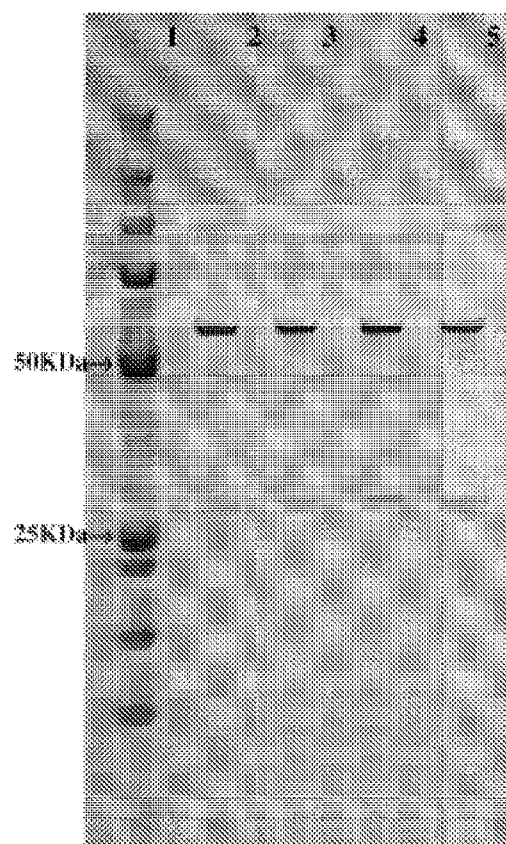
(Figura 8A) SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie de anticuerpos EH12.2H7 purificados:



Carril 1: Marcador de precisión Bio-Rad
 Carril 2: VH4/Vκ4
 Carril 3: VH4/Vκ3
 Carril 4: VH3/Vκ4
 Carril 5: VH3/Vκ3

Se cargó 1 µg de cada anticuerpo

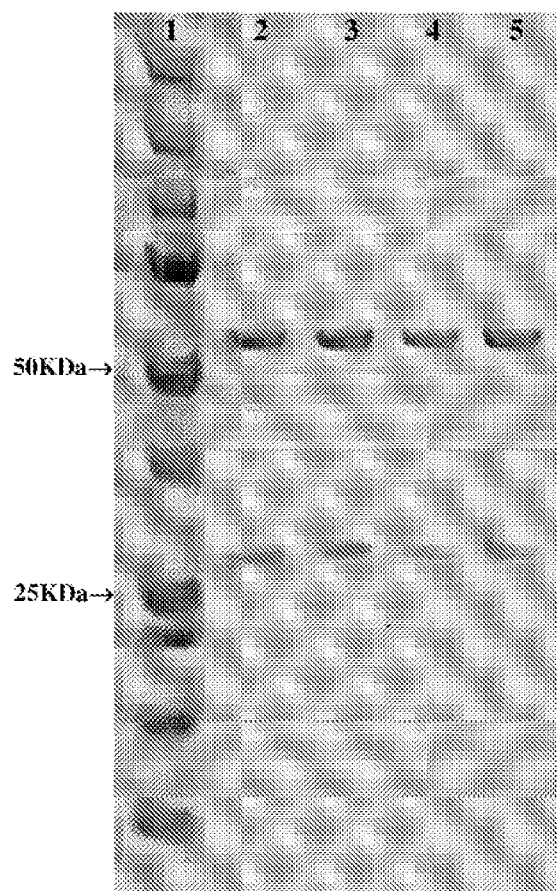
(Figura 8B) SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie de anticuerpos 29E.2A3 purificados:



Carril 1: Marcador de precisión Bio-Rad
Carril 2: VH4/Vk2
Carril 3: VH2/Vk3
Carril 4: VH2/Vk1
Carril 5: VH2/Vk2

Se cargó 1 μ g de cada anticuerpo

(Figura 8C) SDS-PAGE con tinción azul de Coomassie de anticuerpos 24F.10C12 purificados:

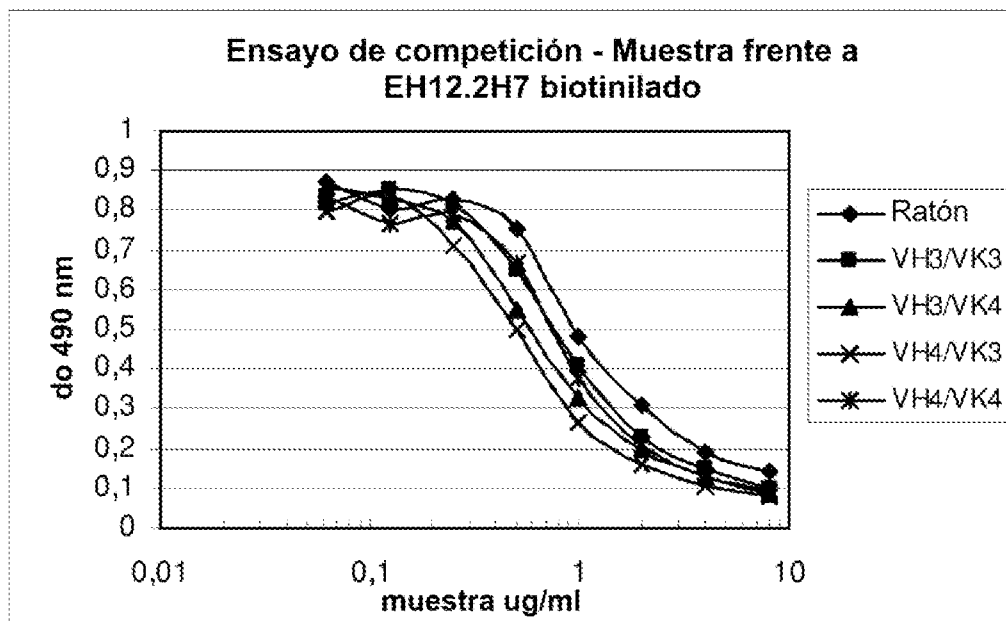


Carril 1: Marcador de precisión Bio-Rad
Carril 2: VH4/Vk4
Carril 3: VH4/Vk2
Carril 4: VH2/Vk3
Carril 5: VH2/Vk2

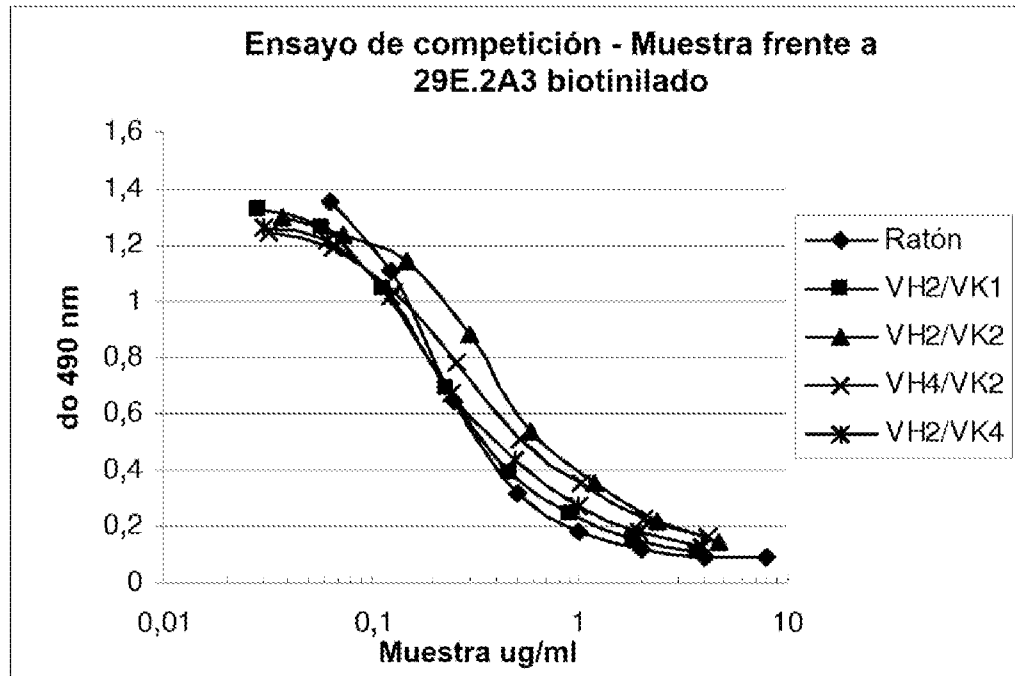
Se cargó 1 µg de cada anticuerpo

Figura 9. Comparación de actividades de anticuerpos humanos compuestos con anticuerpo de referencia de ratón

(Figura 9A) ELISA competitivo de PD-1 humana:



(Figura 9B) ELISA competitivo de PD-L1 humana:



(Figura 9C) ELISA competitivo de PD-L2 humana:

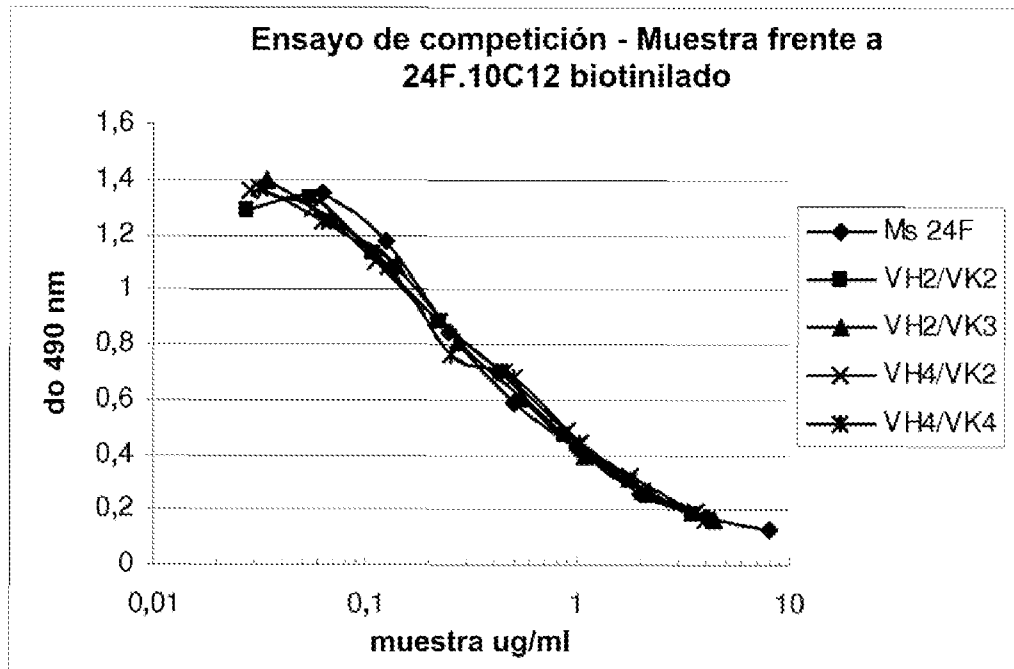


Figura 10: Comparación de unión de CI_{50} de los anticuerpos anti humanos de ratón con anticuerpos humanos compuestos

(Figura 10A) Competición con EH12.2H7 por la unión a PD-1

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	0,82	0,78	0,82	0,77	SD
VK2	0,66	0,98	0,82	0,98	SD
VK3	0,82	0,98	0,76	0,46	SD
VK4	SD	0,90	0,60	0,74	SD

(Figura 10B) Competición con 20E.283 por la unión a PD-L1

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	3,61	0,96	3,21	2,10	5,96
VK2	3,34	1,75	1,68	3,00	7,8
VK3	2,26	2,26	1,92	3,16	9,16
VK4	5,10	1,04	1,64	2,96	7,04

(Figura 10C) Competición con 24F.10C12 por la unión a PD-L2

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	0,82	0,78	0,82	0,77	SD
VK2	0,66	0,98	0,82	0,98	SD
VK3	0,82	0,98	0,76	0,46	SD
VK4	SD	0,90	0,60	0,74	SD

Figura 11: Secuencias de aminoácidos de PD-1, PD-L1 y PD-L2**Secuencia de aminoácidos de PD-1 (SEQ ID NO: 2)**

```

MQIEQAPWV VVAVLQLGWR FGWFLDSEDF FWNEPTTFSPA LLVVTEGUNA 50
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFFEDRSQPG QDCRFRTQL 100
ENGRDFHMSV VRARRNDSGT YLGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTEERRAE 150
VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI 200
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTEPPPPV CVPEQTBYAT 250
IVFPSSMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWFL 288

```

Secuencia de aminoácidos de PD-L1 (SEQ ID NO: 4)

```

MRIFAVPIFM TYWHLNNAFT VTVPKDLVYV EYGSNMTIEC KEPVEKQLDL 50
AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAALQ 100
ITDVKLQDAG VYKOMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTSE 150
HELTCQAEGY PKAEVIWISS DHQVLSGKIT TINSKREEKL FNVISTLRIN 200
TTNEIIFYCT FRRLDPEENH TAEIVIFELP LAHPFNERTH LVILGAILLC 250
LGVALTFIER LRKGRMMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET 290

```

Secuencia de aminoácidos de PD-L2 (SEQ ID NO: 6)

```

MIFLLMLSL ELQLRQIAAL FTVTPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV 50
NLGATIASLQ KVENDTSPHR ERATLLBEQL PLGKASFHIP QVQVRDESOY 100
QCIIIIYGVAV DYKYLTLNVK ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYFL 150
AEVSWPNVSV PANTSHGRTF EGLYQVTSVL RLKPFEGGRNF SCVFWNTHVR 200
ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFTFEC IIAPIPIATV IALRKQLCQR 250
LYSSKDTTKR PVTITKREVN SAI 273

```

Figura 12: Secuencias de aminoácidos de CDR para los anticuerpos humanos compuestos

Anticuerpo	Cadena	CDR	Secuencia	SEQ ID NO.
Anti PD-1	Pesada	CDR1	SSWIH	7
		CDR2	YIYPSTGFTTEYNQKFKD	8
		CDR3	WRDSSGYHAMDY	9
	Ligera	CDR1	RASQSVSTSGYSYMH	10
		CDR2	FGSNLES	11
		CDR3	QHSWEIPYT	12
Anti PD-L1	Pesada	CDR1	SYVMH	13
		CDR2	YVNPFDGTYNEMFKG	14
		CDR3	QAWGYP	15
	Ligera	CDR1	RATESVEYYGTSLVQ	16
		CDR2	AASSVDS	17
		CDR3	QQRVRVPYT	18
Anti PD-L2	Pesada	CDR1	GYTMH	19
		CDR2	YINPRSGYTEYNQKFKD	20
		CDR3	FWFAY	21
	Ligera	CDR1	KSSQSLINSGNQKNYLT	22
		CDR2	WASTRES	23
		CDR3	QNDYSYPLT	24

Figura 13: Las secuencias de aminoácidos para las cadenas pesada y ligera de regiones variables de anticuerpos humanos compuestos.

Cadena pesada VH1 anti PD-1 (SEQ ID NO 25)

QVQLVQSGAELKQPGASVKMSCKASGYSTSSWIHWVKQAPQGQLEWIGYIYPSTGFTTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSLVTVSS

Cadena pesada VH2 anti PD-1 (SEQ ID NO 26)

QVQLVQSGAEVVKQPGASVKMSCKASGYSTSSWIHWVKQAPQGQLEWIGYIYPSTGFTTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSLVTVSS

Cadena pesada VH3 anti PD-1 (SEQ ID NO 27)

QVQLVQSGHEVVKQPGASVKMSCKASGYSTSSWIHWVKQAPQGQLEWIGYIYPSTGFTTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSLVTVSS

Cadena pesada VH4 anti PD-1 (SEQ ID NO 28)

QVQLVQSGHEVVKQPGASVKMSCKASGYSTSSWIHWVRQAPQGQLEWIGYIYPSTGFTTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSLVTVSS

Cadena pesada VH5 anti PD-1 (SEQ ID NO 29)

QVQLVQSGHEVVKQPGASVKVSKASGYSTSSWIHWVRQAPQGQLEWIGYIYPSTGFTTEYNQKFKDRA
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSLVTVSS

Cadena ligera VK1 anti PD-1 (SEQ ID NO 30)

DIVLTQSPASLTLSFGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLSEEDFATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

Cadena ligera VK2 anti PD-1 (SEQ ID NO 31)

DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLSEDFATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

Cadena ligera VK3 anti PD-1 (SEQ ID NO 32)

EIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLSEDFATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

Cadena ligera VK4 anti PD-1 (SEQ ID NO 33)

DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLSEDFAVYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK

Cadena pesada VH1 anti PD-L1 (SEQ ID NO 34)

EVQLVQSGPELKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFDNGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARQAWGYFWGQGTSLVTVSS

Cadena pesada VH2 anti PD-L1 (SEQ ID NO 35)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFDNGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYFWGQGTSLVTVSS

Figura 13 (Continuación)

Cadena pesada VH3 anti PD-L1 (SEQ ID NO 36)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYFWGQGTILVTVSS

Cadena pesada VH4 anti PD-L1 (SEQ ID NO 37)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYFWGQGTILVTVSS

Cadena pesada VH5 anti PD-L1 (SEQ ID NO 38)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFFNDGTKYNEMFKGRA
TITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYFWGQGTILVTVSS

Cadena ligera VK1 anti PD-L1 (SEQ ID NO 39)

DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQKPGQPPKLLIYAASSVD SGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEEEAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK2 anti PD-L1 (SEQ ID NO 40)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQKPGQPPKLLIYAASSVD SGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK3 anti PD-L1 (SEQ ID NO 41)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQKPGQPPKLLIYAASSVD SGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK4 anti PD-L1 (SEQ ID NO 42)

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQKPGQPPKLLIYAASSVD SGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAATYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

Cadena pesada VH1 anti PD-L2 (SEQ ID NO 43)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARPWFAYWGQGTILVTVSS

Cadena pesada VH2 anti PD-L2 (SEQ ID NO 44)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTILVTVSS

Cadena pesada VH3 anti PD-L2 (SEQ ID NO 45)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTILVTVSS

Cadena pesada VH4 anti PD-L2 (SEQ ID NO 46)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTILVTVSS

Figura 13 (Continuación)

Cadena pesada VH5 anti PD-L2 (SEQ ID NO 47)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINFRSGYTEYNQKFKDRI
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLETVSS

Cadena ligera VK1 anti PD-L2 (SEQ ID NO 48)

DIVMTQSPASLTIVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK2 anti PD-L2 (SEQ ID NO 49)

DIVMTQSPASLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK3 anti PD-L2 (SEQ ID NO 50)

DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

Cadena ligera VK4 anti PD-L2 (SEQ ID NO 51)

DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
SGSGSGTDFTLTITSSSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

Figura 14

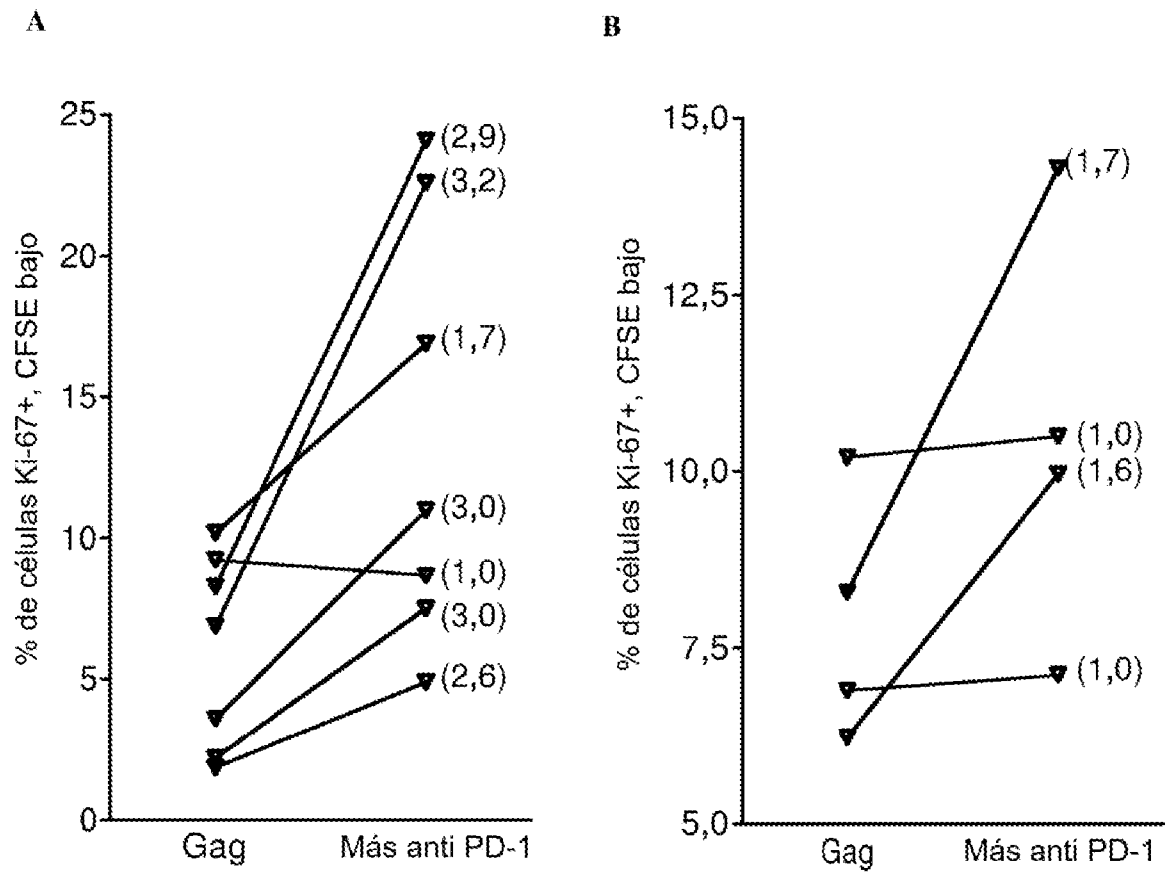


Figura 15

