



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 977 137**

⑮ Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**A61K 49/16** (2006.01)  
**A61K 51/10** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**G01N 33/563** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2017** PCT/US2017/050851

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **22.03.2018** WO18052818

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2017** E 17851358 (6)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024** EP 3512885

⑮ Título: **Anticuerpos anti-PD-1**

⑩ Prioridad:

**16.09.2016 US 201662395832 P**  
**14.06.2017 US 201762519590 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.08.2024**

⑮ Titular/es:

**SHANGHAI HENLIUS BIOTECH, INC. (100.0%)**  
Room 303, 304, Block 7, No. 1999 Zhangheng  
Road, Pilot Free Trade Zone  
Shanghai, CN

⑮ Inventor/es:

**JIANG, WEIDONG;**  
**LIN, PEI-HUA y**  
**TSENG, CHI-LING**

⑮ Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 977 137 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
- 5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas
- Esta solicitud internacional PCT reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. No. 62/395,832, presentada el 16 de septiembre de 2016. Esta solicitud internacional PCT también reivindica el beneficio y la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. No. 62/519,590, presentada el 14 de junio de 2017.
- 10 Campo de la invención
- La invención se refiere en general a los anticuerpos anti-PD-1 y a los métodos para usar los mismos en el tratamiento de cánceres humanos.
- 15 Antecedentes de la invención
- PD-1 (muerte programada-1, por sus siglas en inglés) es un receptor clave del punto de control inmunitario que se expresa en los linfocitos T y B activados y actúa como mediador de la inmunosupresión. PD-1 es un miembro de la familia de receptores CD28, que incluye CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 y BTLA (por sus siglas en inglés, respectivamente). Se han identificado dos ligandos de glicoproteínas de superficie celular para PD-1, el ligando de muerte programada-1 (PD-L1, por sus siglas en inglés) y el ligando de muerte programada-2 (PD-L2), que se expresan en las células presentadoras de antígenos, así como en muchos cánceres humanos, y se ha demostrado que regulan negativamente la activación de las células T y la secreción de citocinas al unirse a PD-1 (Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001). A diferencia de CTLA-4, PD-1 funciona principalmente en tejidos periféricos en donde las células T activadas se pueden encontrar con los ligandos inmunosupresores PD-L1 (B7-H1) y PD-L2 (B7-DC); (por sus siglas en inglés, respectivamente) expresados por células tumorales y/o estromales (Flies *et al.*, 2011; Topalian *et al.*, 2012a). La inhibición de la interacción PD-1/PD-L1 media una potente actividad antitumoral en modelos preclínicos (patentes de EE.UU. No. 8,008,449 y 7,943,743), y el uso de inhibidores Ab (por sus siglas en inglés) de la interacción PD-1/PD-L1 para tratar el cáncer ha entrado en ensayos clínicos (Brahmer *et al.*, 2010; Flies *et al.*, 2011; Topalian *et al.*, 2012b; Brahmer *et al.*, 2012). WO 2016/077397 describe anticuerpos que se unen selectivamente a PD-1 y sus isoformas y homólogos, y composiciones que comprenden los anticuerpos. US 2016/0159905 describe anticuerpos antagonistas que se unen a la proteína de muerte celular programada-1 (PD-1) y métodos para usar los mismos.
- 35 Existe la necesidad de desarrollar terapias contra el cáncer dirigidas contra PD-1. La presente invención satisface esta y otras necesidades.
- Breve descripción de la invención
- 40 Se proporciona en la invención un anticuerpo anti-PD-1 como se reivindica en la reivindicación 1, una molécula aislada de ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 7, un vector de expresión como se reivindica en la reivindicación 8, una célula que comprende un vector de expresión como se reivindica en la reivindicación 9, un método para producir un anticuerpo anti-PD-1 como se reivindica en la reivindicación 10, una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 como se reivindica en la reivindicación 11, un método para detectar una proteína PD-1 como se reivindica en la reivindicación 12, y una composición para usar en un método para tratar el cáncer en un sujeto como se reivindica en la reivindicación 14. Se describen en la presente anticuerpos anti-PD-1 y/o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. El anticuerpo anti-PD-1 de la invención comprende una secuencia de dominio variable (VL, por sus siglas en inglés) de la cadena ligera (LC, por sus siglas en inglés) que comprende (1) una CDR-L1 (por sus siglas en inglés) que comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVTTAVA (SEQ ID NO: 9); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (SEQ ID NO: 10); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYTIPWT (SEQ ID NO: 11), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC, por sus siglas en inglés) que comprende (1) una CDR-H1 (por sus siglas en inglés) que comprende la secuencia de aminoácidos FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos VSYYYGIDF (SEQ ID NO: 14).
- 55 También se describen en la presente los anticuerpos madurados por afinidad contra el anticuerpo h1G4 (por sus siglas en inglés) anti-PD-1 humanizado. También se describe en la presente, un anticuerpo anti-PD-1 madurado (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1, 33B) que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (LC) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos KASTDVTTAVA (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASLRHT (SEQ ID NO: 16); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYGIPWT (SEQ ID NO: 17), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos FRFSNYGMS (SEQ ID NO: 18); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGGSNAY (SEQ ID NO: 19); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos TSYYYGIDF (SEQ ID NO: 20).
- 65 También se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 madurado (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1, 66E) que

comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (LC) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos KAKQDVTTAVA (SEQ ID NO: 21); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (SEQ ID NO: 10); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYWIPWT (SEQ ID NO: 22), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos VSYYYGIDL (SEQ ID NO: 23).

5 También se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 madurado (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1, 711D) que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (LC) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVTTAVA (SEQ ID NO: 24); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (SEQ ID NO: 10); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYTIPWT (SEQ ID NO: 11), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos 15 TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SSYYYGIDL (SEQ ID NO: 25).

10 Las secuencias de las CDR señaladas en la presente se proporcionan en la Tabla 1 que se muestra a continuación.

20 Tabla 1

SEQ ID NO: 9	KASQDVTTAVA	SEQ ID NO: 18	FRFSNYGMS
SEQ ID NO: 10	WASTRHT	SEQ ID NO: 19	TISGGGSNAY
SEQ ID NO: 11	QQHYTIPWT	SEQ ID NO: 20	TSYYYGIDF
SEQ ID NO: 12	FTFSNYGMS	SEQ ID NO: 21	KAKQDVTTAVA
SEQ ID NO: 13	TISGGGSNIY	SEQ ID NO: 22	QQHYWIPWT
SEQ ID NO: 14	VSYYYGIDF	SEQ ID NO: 23	VSYYYGIDL
SEQ ID NO: 15	KASTDVTTAVA	SEQ ID NO: 24	KASQDVTTAVA
SEQ ID NO: 16	WASLRHT	SEQ ID NO: 25	SSYYYGIDL
SEQ ID NO: 17	QQHYGIPWT		

25 También se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (LC) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 21 y 24; (2) una CDR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o 16; (3) una CDR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 17, 22, y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o 18; (2) una CDR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o 19; y (3) una CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 20, 23, y 25.

30 También se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4, y una secuencia de dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2.

35 También se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8, y una secuencia de dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6.

40 En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo comprende una secuencia Fc (por sus siglas en inglés) de una IgG humana (por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fab, Fab', un F(ab)'<sub>2</sub>, un Fv de cadena única (scFv), un fragmento Fv, un diacuerpo y un anticuerpo lineal (por sus siglas en inglés, respectivamente). En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.

45 En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-PD-1 se conjuga con un agente terapéutico. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-PD-1 se conjuga con una etiqueta. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, la etiqueta se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un tinte fluorescente, y una enzima.

50 La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores. También se proporciona un vector de expresión que codifica la molécula de ácido nucleico de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores. También se proporcionan células que comprenden el vector de expresión de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las

- realizaciones anteriores. La invención también proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores y a recuperar el anticuerpo de la misma a partir del cultivo celular. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula de mamífero es una célula CHO (por sus siglas en inglés). En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, la célula es una línea celular de mamífero estable. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, la línea celular de mamífero estable es una línea celular CHO.
- 5 10 La invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 La invención proporciona un método para detectar una proteína PD-1 en una muestra de un paciente al poner en contacto el anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores con la muestra y al detectar el anticuerpo anti-PD-1 unido a la proteína PD-1. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el anticuerpo anti-PD-1 se usa un ensayo inmunohistoquímico (IHC, por sus siglas en inglés) o en un ensayo ELISA (por sus siglas en inglés).
- 20 La invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad efectiva de la composición al sujeto. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B de linfoma no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón y carcinoma no microcítico de pulmón (NSCLC), cáncer de esófago, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer de vías biliares, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides y cáncer salival (por sus siglas en inglés, respectivamente). En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, al sujeto se le administra además un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento y un agente citotóxico. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, al sujeto se le administra además radioterapia. En algunas realizaciones de acuerdo con (o aplicadas a) cualquiera de las realizaciones anteriores, al sujeto se le administra además un anticuerpo terapéutico contra VEGF, VEGFR2 o EGFR (por sus siglas en inglés, respectivamente).
- 25 30 35 Breve descripción de las figuras
- Figuras 1A-1B. Unión de c1G4 a la proteína recombinante PD-1. La Figura 1A muestra los resultados de los ELISA realizados para comparar la unión a PD-1-His de los anticuerpos anti-PD-1 c1G4 y anti-PD-1 de referencia. La Figura 1B muestra los resultados de un segundo conjunto de los ELISA realizados para comparar la unión a PD-1-AP (por sus siglas en inglés) de los anticuerpos anti-PD-1 c1G4 y anti-PD-1 de referencia. Los datos indican que c1G4 y el anti-PD-1 de referencia son capaces de unirse tanto a PD-1-His como a PD-1-AP.
- 40 45 Figuras 2A-2B. Bloqueo y competencia de la unión al ligando PD-1 de c1G4. La Figura 2A muestra los resultados de los ELISA realizados para comparar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 c1G4 y anti-PD-1 de referencia para bloquear la unión de PD-L1 y PD-1. Se observó que tanto c1G4 como el anti-PD-1 de referencia bloquean la unión de PD-L1 a PD-1. La Figura 2B muestra los resultados de los ELISA realizados para determinar la capacidad del anticuerpo anti-PD-1 c1G4 para competir con el anti-PD-1 de referencia en la unión a PD-1-His. Los datos indican que tanto c1G4 como el anti-PD-1 de referencia son capaces de bloquear la unión de PD-L1 a PD-1, y c1G4 es capaz de competir con el anti-PD-1 de referencia por la unión a PD-1-His.
- 50 55 Figuras 3A-3B. Unión de c1G4 a células CHO-S que expresan PD-1. La unión del anticuerpo c1G4 a las células CHO-S (Figura 3A) y células CHO-S transfectadas con PD-1 (Figura 3B) se probaron por citometría de flujo. Los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 de referencia se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. Los datos indican que c1G4 se unió a las células CHO transfectadas con PD-1 humano pero no a las células CHO no transfectadas.
- 60 65 Figura 4. Bloqueo de la unión del ligando a PD-1 por el anticuerpo c1G4 seleccionado. Se usó un ensayo de citometría de flujo para probar la capacidad del anti-PD-1 c1G4 de bloquear la unión del ligando PD-L1 a las células CHO-S que expresan PD-1. Los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 de referencia se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. El anticuerpo monoclonal anti-PD-1 c1G4 bloqueó la unión de PD-L1 a las células CHO-S transfectadas con PD-1, medida por la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de la tinción. Estos datos demuestran que el anti-PD-1 c1G4 bloquea la unión del ligando PD-L1 a PD-1 en la superficie celular.
- Figuras 5A-5B. Efecto del anti-PD-1 c1G4 en la producción de citocinas en una reacción leucocitaria mixta (MLR, por sus siglas en inglés). El anticuerpo monoclonal c1G4 contra PD-1 humano promueve la secreción de IFN-γ y de IL-2 (por sus siglas en inglés, respectivamente) en un ensayo de reacción leucocitaria mixta. El anti-PD-1 de referencia y Avastin (anti-VEGF) se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. La Figura 5A ilustra una gráfica de barras

que muestra la secreción de IL-2 dependiente de la concentración; la Figura 5B ilustra una gráfica de barras que muestra la secreción de IFN-γ dependiente de la concentración.

Figura 6. Efecto del anti-PD-1 c1G4 sobre la proliferación de células T en una reacción leucocitaria mixta (MLR). El anticuerpo monoclonal c1G4 contra PD-1 humano promueve la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en un ensayo de reacción leucocitaria mixta. El anti-PD-1 de referencia y Avastin (anti-VEGF) se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. La Figura 6A ilustra una gráfica de barras que muestra la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> a varias concentraciones de anticuerpos; la Figura 6B ilustra una gráfica de barras que muestra la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> a distintas concentraciones de anticuerpos.

Figura 7. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del anticuerpo c1G4. Los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de líneas celulares de cáncer de colon humano HT29 y PBMC humanas (por sus siglas en inglés, respectivamente) recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 2:1). Se inyectaron anticuerpos anti-PD-1 por vía intraperitoneal en ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 7A. El volumen tumoral individual en el día 28 se presentó en la Figura 7B. Todos los datos son las medias ± SEM (por sus siglas en inglés).

Figura 8. Alineamiento de secuencias para c1G4 y h1G4. La Figura 8A muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras de c1G4, h1G4 humanizado, región variable de la cadena ligera de línea germinal humana IGKV1-39\*01 (por sus siglas en inglés) y Nivolumab (NIV, por sus siglas en inglés). La Figura 8B muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de c1G4, h1G4 humanizado, región variable de la cadena pesada de la línea germinal humanaIGHV3-11\*04 y Nivolumab (NIV). Las CDR (regiones determinantes complementarias, por sus siglas en inglés) injertadas a partir de c1G4 para la humanización se marcaron en negritas y subrayado.

Figura 9. Unión del anticuerpo humanizado anti-PD-1 a células CHO-S que expresan PD-1. La unión del anticuerpo humanizado h1G4 y el original c1G4 a PD-1 en la superficie celular se probó por citometría de flujo. Los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 de referencia se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente.

Figura 10. Bloqueo de la unión del ligando a PD-1 por el anticuerpo humanizado h1G4. Se usó un ensayo de citometría de flujo para probar la capacidad del anti-PD-1 h1G4 humanizado de bloquear la unión del ligando PD-L1 a las células CHO-S que expresan PD-1. Se probó la capacidad del anti-PD-1 h1G4 de bloquear la unión del ligando PD-L1 a las células CHO-S que expresan PD-1 usando un ensayo de citometría de flujo. Los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 de referencia se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. Tanto c1G4 como h1G4 bloquearon la unión de PD-L1 a las células CHO-S transfectadas con PD-1, medida por la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la tinción.

Las Figuras 11A-11D ilustran la reactividad cruzada de especies de h1G4 con las proteínas PD-1 de humano (Figura 11A), mono Cynomolgus (Figura 11B), ratón (Figura 11C), y rata (Figura 11D). Todos los datos son el promedio de triplicados ± SD (por sus siglas en inglés).

Figura 12. Unión del anticuerpo humanizado anti-PD-1 a células T humanas activadas. La unión de h1G4 humanizado a células T humanas se probó por citometría de flujo. El anticuerpo anti-PD-1 de referencia y Avastin (anti-VEGF) se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente.

Figura 13. Efecto del h1G4 en la producción de citocinas en una reacción leucocitaria mixta (MLR). El anticuerpo humanizado h1G4 contra PD-1 humano promueve la secreción de IFN-γ y de IL-2 en un ensayo de reacción leucocitaria mixta. El anticuerpo anti-PD-1 de referencia y Avastin (anti-VEGF) se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. La Figura 13A ilustra una gráfica de barras que muestra la secreción de IL-2 dependiente de la concentración; la Figura 14B ilustra una gráfica de barras que muestra la secreción de IFN-γ dependiente de la concentración.

Figura 14. Efecto del h1G4 en la proliferación de células T en una reacción leucocitaria mixta (MLR). El anticuerpo humanizado h1G4 contra PD-1 humano promueve la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en un ensayo de reacción leucocitaria mixta. El anticuerpo anti-PD-1 de referencia y Avastin (anti-VEGF) se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. La Figura 14A ilustra una gráfica de barras que muestra la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> a varias concentraciones de anticuerpos; la Figura 14B ilustra una gráfica de barras que muestra la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> a distintas concentraciones de anticuerpos.

Figura 15. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del anticuerpo h1G4 en el modelo de xenoinjerto HT29/PBMC. Los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de líneas celulares de cáncer de colon humano HT29 y PBMC humanas (por sus siglas en inglés, respectivamente) recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Se inyectaron anticuerpos anti-PD-1 por vía intraperitoneal en ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 15A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 15B. Todos los datos son las medias ± SEM.

Figura 16. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del anticuerpo h1G4 en el modelo de xenoinjerto NCI-H292/PBMC. Los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de líneas celulares humanas de NSCLC NCI-H292 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Se inyectaron anticuerpos anti-PD-1 por vía intraperitoneal en ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 16A. El volumen tumoral individual en el día 25 se presentó en la Figura 16B. Todos los datos son las medias ± SEM.

Figura 17. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del anticuerpo h1G4 en ratones hPD1 KI (por sus siglas en inglés). Los ratones humanos PD-1 reactivados (hPD1 KI) (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con células MC38-huPD-L1 (MC38 transfectadas con PD-L1 humano, por sus siglas en inglés). Los tratamientos con anticuerpos se iniciaron cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 75 mm<sup>3</sup>. Los anticuerpos anti-PD-1 se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones dos veces por semana. Todos los datos son las medias ± SD.

Figura 18. Estudio de eficacia de h1G4 en un modelo de xenoinjerto de línea celular de cáncer de mama triple negativo (TNBC) en ratones NSG humanizados (por sus siglas en inglés). Los ratones NSG humanizados (n = 9/grupo) se inocularon por vía subcutánea con células MDA-MB-231. Los tratamientos con anticuerpos se iniciaron cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 60-150 mm<sup>3</sup>. Los días de dosis se indican con flechas. Todos los datos son las medias ± SEM.

Figura 19. Efecto de los anticuerpos anti-PD-1 humanos en la producción de citocinas en una reacción leucocitaria mixta (MLR). Los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 humano promueven la secreción de IFN-γ y la secreción de IL-2 en un ensayo de reacción leucocitaria mixta. El anticuerpo anti-PD-1 de referencia y Avastin (anti-VEGF) se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. La Figura 19A ilustra una gráfica de barras que muestra la secreción de IL-2 dependiente de la concentración; la Figura 19B ilustra una gráfica de barras que muestra la secreción de IFN-γ dependiente de la concentración.

Figura 20. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de anticuerpos anti-PD-1 humanos en el modelo de xenoinjerto HT29/PBMC. Los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de la línea celular de cáncer de colon humano HT29 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Se inyectaron anticuerpos anti-PD-1 por vía intraperitoneal en ratones dos veces por semana a partir del día 1. El volumen tumoral se midió dos veces por semana. Todos los datos son las medias ± SEM.

Figura 21. Combinación de anti-PD-1 y anticuerpo monoclonal anti-VEGF en el modelo de xenoinjerto HT29/PBMC. Los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de la línea celular de cáncer de colon humano HT29 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Se inyectaron intraperitonealmente en ratones mAb anti-PD-1, mAb anti-VEGF (HLX04) o mAb anti-PD-1 más mAb anti-VEGF. Los días de dosis se indican con flechas. El volumen tumoral se midió dos veces por semana. Todos los datos son las medias ± SEM.

Figura 22. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del mAb anti-PD-1 más el mAb anti-VEGF en el modelo de xenoinjerto de NSCLC en ratones. Los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de células humanas de NSCLC NCI-H292 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Los anticuerpos anti-PD-1 (h1G4) y anti-VEGF (HLX04) se inyectaron por vía intraperitoneal en los ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 22A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 22B. Todos los datos son las medias ± SEM.

Figura 23. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del mAb anti-PD-1 más el mAb anti-VEGFR2 en el modelo de xenoinjerto de NSCLC en ratones. Los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de células humanas de NSCLC NCI-H292 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Los anticuerpos anti-PD-1 (h1G4), y anti-VEGFR2 (HLX06) se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 23A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 23B. Todos los datos son las medias ± SEM.

Figura 24. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del mAb anti-PD-1 más el mAb anti-EGFR en el modelo de xenoinjerto de NSCLC en ratones. Los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de células humanas de NSCLC NCI-H292 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Los anticuerpos anti-PD-1 (HLX10) y anti-EGFR (HLX07) se inyectaron por vía intraperitoneal en los ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 24A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 24B. Todos los datos son las medias ± SEM.

Figura 25. Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del mAb anti-PD-1 más el mAb anti-EGFR en el modelo de xenoinjerto en ratones HT-29 (KRAS<sup>WT</sup>, BRAF<sup>V600E</sup>). Los ratones (n = 5/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de células cancerosas de colon humano HT-29 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Los anticuerpos anti-PD-1 (HLX10) y anti-EGFR (HLX07) se inyectaron por vía intraperitoneal en los ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 25A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 25B. Todos los datos son las medias ± SEM.

## Descripción detallada de la invención

- La presente invención proporciona anticuerpos anti-PD-1 novedosos. Los inventores han descubierto sorprendentemente que los anticuerpos anti-PD-1, por ejemplo, los anticuerpos químicos c1G4 y h1G4 humanizado descritos en la presente, así como sus anticuerpos madurados por afinidad, por ejemplo, 33B, 66E y 711D, potencian la secreción de IL-2 e IFN-γ por las células T y la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente también potencian la eficacia y/o las actividades antitumorales en comparación con OPDIVO® (Nivolumab), un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 anti-PD-1 aprobado por la FDA (por sus siglas en inglés) que se usa para tratar el cáncer.
- 10 También se proporcionan inmunoconjungados, ácidos nucleicos que codifican los nuevos anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente, y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas). La invención también proporciona métodos para usar los anticuerpos anti-PD-1 novedosos para detectar PD-1 en una muestra (tal como una muestra *in vivo* o *ex vivo*), y composiciones que comprenden tales anticuerpos para usar en el tratamiento del cáncer.

## 15 Definiciones

Como se usa en la presente, "tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. A efectos de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas resultantes de la enfermedad, 20 disminuir la extensión de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (por ejemplo, prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la propagación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la recurrencia de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado de la enfermedad, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de uno o más medicamentos necesarios para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, aumentar o mejorar la calidad de vida, aumentar el 25 aumento de peso y/o prolongar la supervivencia. También abarca la reducción de las consecuencias patológicas del cáncer (tal como, por ejemplo, el volumen del tumor). Los métodos proporcionados en la presente contemplan uno o varios de estos aspectos del tratamiento.

30 Los términos "recurrencia", "recaída" o "recidivante" se refieren al regreso de un cáncer o enfermedad tras la valoración clínica de la desaparición de la enfermedad. Un diagnóstico de metástasis a distancia o recidivante local se puede considerar una recaída.

El término "refractario" o "resistente" se refiere a un cáncer o enfermedad que no ha respondido al tratamiento.

35 El término "terapia adyuvante" se refiere al tratamiento dado después de la terapia primaria, usualmente la cirugía. La terapia adyuvante para el cáncer o la enfermedad puede incluir inmunoterapia, quimioterapia, radioterapia, o terapia hormonal.

40 El término "terapia de mantenimiento" se refiere al tratamiento programado que se da para ayudar a mantener los efectos de un tratamiento anterior. La terapia de mantenimiento se da a menudo para ayudar a mantener el cáncer en remisión o prolongar la respuesta a un tratamiento específico, independientemente de la progresión de la enfermedad.

45 El término "cáncer invasivo" se refiere al cáncer que se ha extendido más allá de la capa de tejido en la que comenzó, a los tejidos circundantes normales. Los cánceres invasivos pueden ser metastásicos o no.

45 El término "cáncer no invasivo" se refiere a un cáncer muy incipiente o a un cáncer que no se ha extendido más allá del tejido de origen.

50 El término "supervivencia sin progresión" en oncología se refiere al tiempo durante y después del tratamiento en que un cáncer no crece. La supervivencia sin progresión incluye la cantidad de tiempo que los pacientes han experimentado una respuesta completa o parcial, así como la cantidad de tiempo que los pacientes han experimentado una enfermedad estable.

55 El término "enfermedad progresiva" en oncología se puede referir a un crecimiento tumoral mayor al 20 % desde el inicio del tratamiento, ya sea debido a un aumento de la masa o a una diseminación del tumor.

60 Un "trastorno" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Por ejemplo, mamíferos que padecen o necesitan profilaxis contra la actividad anómala de PD-1. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas condiciones patológicas las cuales predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos a tratar en la presente incluyen cáncer (tales como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.).

65 Un "tumor", como se usa en la presente, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásicos, ya sean malignos o benignos, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

65 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales

únicos (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos con especificidad polipeptídica, anticuerpos policlonales, anti-anticuerpos de cadena única y fragmentos de anticuerpos (ver a continuación) siempre que se unan específicamente a un polipéptido nativo y/o presenten una actividad biológica o inmunológica de esta invención. De acuerdo con una realización, el anticuerpo se une a una forma oligomérica de una proteína objetivo, 5 por ejemplo, una forma trimérica. De acuerdo con otra realización, el anticuerpo se une específicamente a una proteína, cuya unión puede ser inhibida por un anticuerpo monoclonal de esta invención (por ejemplo, un anticuerpo depositado de esta invención, etc.). La expresión "fragmento funcional o análogo" de un anticuerpo es un compuesto que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo al que se hace referencia. Por ejemplo, un fragmento funcional 10 o análogo de un anticuerpo de esta invención puede ser uno que se pueda unir específicamente a PD-1. En una realización, el anticuerpo puede prevenir o reducir sustancialmente la capacidad de PD-1 para inducir la proliferación celular.

Un "anticuerpo aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir con los usos 15 diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En las realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente a más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna por el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE (por sus siglas en inglés) bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul 20 de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, ordinariamente, el anticuerpo aislado se preparará por al menos un paso de extracción.

La unidad básica de 4 cadenas de los anticuerpos es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas 25 ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM (por sus siglas en inglés) consiste en 5 de las unidades básicas del heterotetrámero junto con un polipéptido adicional llamado cadena J y, por lo tanto, contiene 10 sitios de unión a antígenos, mientras que los anticuerpos IgA (por sus siglas en inglés) secretados se pueden polimerizar para formar conjuntos polivalentes que comprenden de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas generalmente tiene aproximadamente 150.000 Daltones. Cada cadena 30 L se enlaza a una cadena H por un puente disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se enlazan entre sí por uno o más puentes disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el N-terminal, un dominio variable (VH, por sus siglas en inglés) seguido de tres dominios constantes (CH, por sus siglas en inglés) para cada una de las cadenas  $\alpha$  y  $\gamma$ , y cuatro 35 dominios CH para los isotipos  $\mu$  y  $\epsilon$ . Cada cadena L tiene en el N-terminal, un dominio variable (VL, por sus siglas en inglés) seguido de un dominio constante (CL, por sus siglas en inglés) en su otro extremo. El VL está alineado con el VH, y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Se cree que determinados residuos de aminoácidos forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El emparejamiento de un VH y un VL forma un único sitio de unión al antígeno. Para conocer la estructura y las propiedades 40 de las distintas clases de anticuerpos, ver, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8<sup>th</sup> ed, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa y lambda, basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia 45 de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (por sus siglas en inglés, respectivamente), cuyas cadenas pesadas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\mu$ , respectivamente. Las clases  $\gamma$  y  $\alpha$  se dividen a su vez en subclases con respecto a las diferencias relativamente menores en la secuencia y función del CH, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2.

50 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media en la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo del intervalo de 1-10 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables denominados regiones marco (FR, por sus siglas en inglés) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los 55 dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés).

65 Como se usa en la presente, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" se refiere a los sitios no

contiguos de combinación de antígenos que se encuentran en la región variable de los polipéptidos de cadena ligera y pesada. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977); Kabat *et al.*, *U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest"* (1991); por Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); y MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), en donde las definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de cualquiera de las dos definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes de los mismos se entiende dentro del ámbito del término como se define y usa en la presente. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR definidas por cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen a continuación en la Tabla 2 a modo de comparación.

10

Tabla 2

	Kabat <sup>1</sup>	Chothia <sup>2</sup>	MacCallum <sup>3</sup>
VH CDR1	31-35	26-32	30-35
VH CDR2	50-65	53-55	47-58
VH CDR3	95-102	96-101	93-101
VL CDR1	24-34	26-32	30-36
VL CDR2	50-56	50-52	46-55
VL CDR3	89-97	91-96	89-96

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes, en menores cantidades. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Asimismo, a diferencia de los preparados de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra distintos determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que se pueden sintetizar sin contaminación por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no se debe interpretar como un requisito para la producción del anticuerpo por un método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden preparar por la metodología del hibridoma descrita por primera vez por Kohler *et al.* *Nature*, 256:495 (1975), o se puede hacer usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas animales o vegetales (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de bibliotecas de anticuerpos fago usando las técnicas descritas en Clarkson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991), Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), y los Ejemplos a continuación, por ejemplo.

30 Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen anticuerpos "químicos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten una actividad biológica de esta invención (ver la patente de EE.UU. No. 4,816,567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos químicos de interés en la presente incluyen anticuerpos "primatizados" que incluyen secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, simio, etc.) y secuencias de región constante humana.

40 Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión al antígeno, así como un CL y al menos dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

45 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (ver la patente de EE.UU. No. 5,641,870, ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La expresión "anticuerpos lineales" se refiere en general a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd (por sus siglas en inglés) en tandem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

55 La digestión de los anticuerpos con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento residual "Fc", denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (VH), y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')<sub>2</sub> de gran tamaño que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por puentes disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y aún son capaces de entrecruzar el antígeno. Los fragmentos Fab' se

5 diferencian de los Fab por tener adicionalmente unos pocos residuos en el terminal carboxilo del dominio CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para Fab' en el cual el residuo de cisteína de los dominios constantes porta un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

10 El fragmento Fc comprende las porciones carboxilos terminales de ambas cadenas H unidas por puentes disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos vienen determinadas por secuencias de la región Fc, que es también la parte reconocida por los receptores Fc (FcR, por sus siglas en inglés) que se encuentran en ciertos tipos de células.

15 Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una "modificación de aminoácidos" como se define en la presente. Preferiblemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una 20 región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. En una realización, la región Fc variante en la presente poseerá al menos aproximadamente 80 % de homología, al menos aproximadamente 85 % de homología, al menos aproximadamente 90 % de homología, al menos aproximadamente 95 % de homología, o al menos aproximadamente 99 % de homología con una región Fc de secuencia nativa. De acuerdo con otra realización, la región Fc variante en la presente poseerá al menos 80 % de homología, al menos 85 % de homología, al menos 90 % de homología, al menos 95 % de homología, o al menos 99 % de homología con una región Fc de un polipéptido parental.

25 El término "polipéptido que comprende una región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o inmunoadhesina (ver las definiciones en la presente), que comprende una región Fc. La lisina C-terminal (residuo 447 de acuerdo con el sistema de numeración de EU, por sus siglas en inglés) de la región Fc se puede eliminar, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que incluye polipéptidos, incluyendo anticuerpos, que tienen una región Fc de acuerdo con esta invención puede incluir poblaciones de polipéptidos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de polipéptidos sin residuos K447 eliminados o poblaciones de polipéptidos que tienen una mezcla de polipéptidos con y sin 30 el residuo K447.

35 Las "funciones efectoras" de los anticuerpos se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión a receptores Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de la superficie celular; y activación de células B. Una "región Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Se describen ejemplos de secuencias Fc en, por ejemplo, pero no se limitan a, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest. 5<sup>o</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

40 "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y otro de la cadena ligera en asociación estrecha y no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que aportan los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo.

45 Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

50 Los "Fv de cadena única" también abreviados como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo conectados en una cadena polipeptídica única. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión del sFv, ver Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*.

55 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados por la construcción de fragmentos sFv (ver el párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios VH y VL, de modo tal que se consigue el emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, resultando en un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígenos. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los que los dominios VH y VL de los dos anticuerpos están presentes en cadenas polipeptídicas diferentes. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

60 65 las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores) son anticuerpos químéricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados

son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano con la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes.

Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se pueden realizar para perfeccionar aún más el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todas las FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, ver Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" u "homología" con respecto a las secuencias de polipéptidos y anticuerpos identificadas en la presente se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en el polipéptido que se está comparando, después de alinear las secuencias considerando cualquier sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que están dentro de la habilidad en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR); (por sus nombres en inglés, respectivamente). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo en toda la longitud completa de las secuencias comparadas. Sin embargo, para los fines de la presente, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de computadora de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente se ha archivado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, en donde está registrado con el número TXU510087. El programa ALIGN-2 está a disposición del público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 se debe compilar para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

Los términos "receptor Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En una realización, un FcR de esta invención es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII (por sus siglas en inglés), incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente 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 citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (ITAM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptor (ITIM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático (ver la revisión M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). El término incluye alotipos, tales como los alotipos FcγRIIIA: FcγRIIIA-Phe158, FcγRIIIA-Val158, FcγRIIA-R131, y/o FcγRIIA-H131. Los FcR se revisan en Ravetch and 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, incluidos los que se identifiquen en el futuro, quedan abarcados por el término "FcR" en la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn (por sus siglas en inglés), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

El término "FcRn" se refiere al receptor Fc neonatal (FcRn). El FcRn es estructuralmente similar al Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y consiste en una cadena α unida de forma no covalente a la β2-microglobulina. Las múltiples funciones del receptor Fc neonatal FcRn se revisan en Ghetie and Ward (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766. El FcRn interviene en el suministro pasivo de inmunoglobulinas IgG de la madre a la cría y en la regulación de los niveles séricos de IgG. El FcRn puede actuar como receptor de salvamento, uniendo y transportando IgG pinocitadas en forma intacta tanto dentro como a través de las células, y rescatándolas de una ruta de degradación por defecto.

El "dominio CH1" de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio "C1" o "H1") se extiende usualmente desde aproximadamente el aminoácido 118 hasta aproximadamente el aminoácido 215 (sistema de numeración de EU).

La "región bisagra" se define generalmente como la que va de Glu216 a Pro230 de la IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG se pueden alinear con la secuencia IgG1 al colocar en las mismas posiciones el primer y el último residuo de cisteína que forman uniones S-S entre cadenas pesadas.

La "región bisagra inferior" de una región Fc se define normalmente como el tramo de residuos inmediatamente C-terminal a la región bisagra, es decir, los residuos 233 a 239 de la región Fc. En informes anteriores, la unión del FcR se atribuyó generalmente a residuos de aminoácidos en la región inferior de bisagra de una región Fc de IgG.

5 El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio "C2" o "H2") se extiende usualmente desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 340 aproximadamente. El dominio CH2 es único en el sentido de que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta se interponen dos cadenas ramificadas de hidratos de carbono ligadas al N. Se ha especulado que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec Immunol.* 22:161-206 (1985).

10 El "dominio CH3" (también denominado dominio "C2" o "H3") comprende el tramo de residuos C-terminal a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde aproximadamente el residuo de aminoácido 341 hasta el extremo C-terminal de una secuencia de anticuerpo, típicamente en el residuo de aminoácido 446 o 447 de una IgG).

15 Una "región Fc funcional" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia nativa. Las "funciones efectoras" ejemplares incluyen la unión a C1q; la citotoxicidad dependiente del complemento; la unión al receptor Fc; la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); la fagocitosis; la regulación descendente de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B; BCR, por sus siglas en inglés), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden valorar usando varios ensayos tal como se divultan en la presente, por ejemplo.

20 "C1q" es un polipéptido que incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. C1q, junto con dos proteasas de serina, C1r y C1s, forma el complejo C1, el primer componente de la ruta de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés). El C1q humano se puede adquirir comercialmente, por ejemplo, en Quidel, San Diego, CA.

25 El término "dominio de unión" se refiere a la región de un polipéptido que se une a otra molécula. En el caso de un FcR, el dominio de unión puede comprender una porción de una cadena polipeptídica del mismo (por ejemplo, la cadena alfa del mismo) que es responsable de unir una región Fc. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena FcR alfa.

30 35 Un anticuerpo con una variante de Fc de IgG con afinidad de unión a FcR o actividad de ADCC "alterada" es aquel que ha potenciado o disminuido la actividad de unión a FcR (por ejemplo, FcγR o FcRn) y/o la actividad de ADCC en comparación con un polipéptido parental o con un polipéptido que comprende una región Fc de secuencia nativa. La variante Fc que "muestra una unión aumentada" a un FcR se une al menos a un FcR con mayor afinidad (por ejemplo, menor valor aparente de  $K_d$  o  $IC_{50}$ , por sus siglas en inglés, respectivamente) que el polipéptido parental o una secuencia nativa Fc de IgG. De acuerdo con algunas realizaciones, la mejora en la unión en comparación con un polipéptido parental es de aproximadamente 3 veces, preferiblemente de aproximadamente 5, 10, 25, 50, 60, 100, 150, 200, hasta 500 veces, o de aproximadamente 25 % a 1000 % de mejora en la unión. La variante polipeptídica que "muestra una unión disminuida" a un FcR, se une al menos a un FcR con menor afinidad (por ejemplo, mayor  $K_d$  aparente o mayor valor de  $IC_{50}$ ) que un polipéptido parental. La disminución de la unión en comparación con un polipéptido parental puede ser de aproximadamente 40 % o más de disminución de la unión.

40 45 50 55 La "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a los receptores Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), neutrófilos y macrófagos) permite a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula objetivo portadora de antígeno y subsecuentemente destruir a la célula objetivo con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para tal destrucción. Las células primarias para la mediación de ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991). Para valorar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de EE.UU. No. 5,500,362 o 5,821,337 o en los Ejemplos a continuación. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativa o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede valorar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes *et al.* *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

60 65 El polipéptido que comprende una región Fc variante que "muestra una ADCC aumentada" o media en la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más efectivamente que un polipéptido que tiene el Fc de IgG de tipo silvestre o un polipéptido parental es aquel que, *in vitro* o *in vivo*, es sustancialmente más efectiva para mediar en la ADCC, cuando las cantidades de polipéptido con región Fc variante y el polipéptido con región Fc de tipo silvestre (o el polipéptido parental) en el ensayo son esencialmente las mismas. Generalmente, tales variantes se identificarán usando cualquier ensayo de ADCC *in vitro* conocido en la técnica, tal como ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC, por ejemplo, en un modelo animal, etc. En una realización, la variante preferida es de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 100 veces, por ejemplo, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 veces, más efectiva en la mediación de ADCC que el Fc de tipo silvestre (o polipéptido parental).

65 La "citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia con la unión del primer componente del sistema

del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno correspondiente. Para valorar la activación del complemento, un ensayo de CDC, por ejemplo, como el descrito en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). En la patente de EE.UU. No. 6,194,551B1 y en WO99/51642 se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida. Ver también Idusogie *et al.* *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Una "cantidad efectiva" de un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o composición como se divulga en la presente es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad efectiva" se puede determinar empíricamente y por métodos conocidos relacionados con el propósito declarada. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o composición como se divulga en la presente, efectiva para "tratar" una enfermedad o trastorno en un mamífero (también conocido como paciente). En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o de la composición divulgada en la presente puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño o el peso del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o la composición divulgados en la presente pueden prevenir el crecimiento y/o eliminar células cancerosas existentes, pueden ser citostáticos y/o citotóxicos. En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad inhibitoria del crecimiento. En otra realización, la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad que prolonga la supervivencia de un paciente. En otra realización, la cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad que mejora la supervivencia libre de progresión de un paciente.

Una "cantidad inhibitoria del crecimiento" de un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o composición como se divulga en la presente invención es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibitoria del crecimiento" de un polipéptido, anticuerpo, antagonista o composición de esta invención con el fin de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y por métodos conocidos o por los ejemplos proporcionados en la presente.

Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o composición de esta invención es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o composición de la presente invención a efectos de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y por métodos conocidos en la técnica.

Una "cantidad inhibitoria del crecimiento" de un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o composición de esta invención es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibitoria del crecimiento" de un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) o composición de esta invención con el fin de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y por métodos conocidos o por ejemplos proporcionados en la presente.

Como se usa en la presente, por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente compatible" se entiende un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, por ejemplo, el material puede ser incorporado en una composición farmacéutica administrada a un paciente sin causar ningún efecto biológico indeseable significativo o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición en la que está contenido.

Los portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables han cumplido preferiblemente las normas exigidas de pruebas toxicológicas y de fabricación y/o están incluidos en la Guía de Ingredientes Inactivos elaborada por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (Inactive Ingredient Guide, U.S. Food and Drug Administration, por su nombre en inglés).

El término "detectar" incluye determinar la presencia o ausencia de una sustancia o cuantificar la cantidad de una sustancia (tal como PD-1). El término se refiere así al uso de los materiales, composiciones y métodos de la presente invención para determinaciones cualitativas y cuantitativas. En general, la técnica particular usada para la detección no es crítica para la práctica de la invención.

Por ejemplo, "detectar" de acuerdo con la invención puede incluir: observar la presencia o ausencia de producto génico PD-1, moléculas de ARNm o un polipéptido PD-1; un cambio en los niveles de un polipéptido PD-1 o cantidad unida a un objetivo; un cambio en la función/actividad biológica de un polipéptido PD-1. En algunas realizaciones, "detectar" puede incluir la detección de niveles de PD-1 de tipo silvestre (por ejemplo, niveles de ARNm o polipéptido). La detección puede incluir la cuantificación de un cambio (aumento o disminución) de cualquier valor entre 10 % y 90 %, o de cualquier valor entre 30 % y 60 %, o mayor al 100 %, en comparación con un control. La detección puede incluir la cuantificación de un cambio de cualquier valor entre 2 veces y 10 veces, inclusive, o más, por ejemplo, 100 veces.

La palabra "etiqueta", como se usa en la presente, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo, etiquetas radioisotópicas o fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que sea detectable.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente se refiere al rango de error usual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "sobre" un valor o parámetro en la presente incluye (y describe) aspectos dirigidos a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción referida a "sobre X" incluye la descripción de "X"

5

Se entiende que los aspectos y las realizaciones de la invención descritos en la presente incluyen aspectos y realizaciones que "comprenden", "consisten" y "consisten esencialmente en".

10 Anticuerpos anti-PD-1

10

La presente invención se basa en la identificación de nuevos anticuerpos que se unen al receptor PD-1 (PD-1). Los anticuerpos anti-PD-1 se pueden usar en varios métodos terapéuticos y de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-1 se pueden usar solos o en combinación con otros agentes en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una expresión anormal de PD-1 o una actividad anormal de PD-1, incluyendo, por ejemplo, melanoma, NSCLC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B de linfoma no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón), cáncer de esófago, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer de vías biliares, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides. Los anticuerpos proporcionados en la presente también se pueden usar para detectar la proteína PD-1 en pacientes o muestras de pacientes al administrar los anticuerpos anti-PD-1 a pacientes y detectar el anticuerpo anti-PD-1 unido a la proteína PD-1 en una muestra del paciente (por ejemplo, *in vivo* o *ex vivo*) o al poner en contacto los anticuerpos anti-PD-1 con muestras de pacientes y detectar cualitativa o cuantitativamente el anticuerpo anti-PD-1 unido a la proteína PD-1.

20

25 La proteína de muerte celular programada 1 (también conocida como PD-1 y CD279 (grupo de diferenciación 279)), es una proteína que en humanos está codificada por el gen *PDCD1*. PD-1 es un receptor de superficie celular que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa en células T y pro-B. PD-1 se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-1, que funciona como punto de control inmunitario, desempeña un papel importante en la regulación del sistema inmunitario al prevenir la activación de las células T, lo que a su vez reduce la autoinmunidad y favorece la autotolerancia.

30

30 El efecto inhibidor de PD-1 se consigue a través de un mecanismo dual de promoción de la apoptosis (muerte celular programada) en las células T antígeno específicas de los ganglios linfáticos, al tiempo que reduce la apoptosis en las células T reguladoras (células T supresoras).

35

Un anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo que se une a PD-1 con suficiente afinidad y especificidad. Preferiblemente, un anticuerpo anti-PD-1 proporcionado en la presente (o el fragmento de unión a antígeno del mismo) se puede usar como agente terapéutico para dirigirse e interferir en enfermedades o condiciones en donde esté involucrada la actividad PD-1. Un anticuerpo anti-PD-1 usualmente no se une a otra superfamilia de inmunoglobulinas. Preferiblemente, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-PD-1.

40

El anticuerpo anti-PD-1 puede comprender las CDR, la región variable de cadena pesada, y/o la región variable de cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos divulgados en la presente.

45

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 de la invención es un anticuerpo c1G4 anti-PD-1 quimérico y/o anti-PD-1 humanizado h1G4, que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (LC) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVTTAVA (SEQ ID NO: 9); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (SEQ ID NO: 10); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYTIPWT (SEQ ID NO: 11), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos VSYYYGIDF (SEQ ID NO: 14).

50

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de longitud completa de las cadenas ligeras y pesadas de c1G4 y h1G4 y sus secuencias CDR se proporcionan en el listado de secuencias que se muestra a continuación.

55

También se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 4, y una secuencia de dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2.

60

También se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 8, y una secuencia de dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6.

65

La presente divulgación también describe anticuerpos madurados por afinidad contra el anticuerpo h1G4 anti-PD-1 humanizado. Se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 madurado (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1, 33B) que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (LC) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende

5 la secuencia de aminoácidos KASTDVTTAVA (SEQ ID NO: 15); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASLRHT (SEQ ID NO: 16); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYGIPWT (SEQ ID NO: 17), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos FRFSNYGMS (SEQ ID NO: 18); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGGSNAY (SEQ ID NO: 19); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos TSYYYGIDF (SEQ ID NO: 20).

10 Se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 madurado (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1, 66E) que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (LC) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos KAKQDVTTAVA (SEQ ID NO: 21); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (SEQ ID NO: 10); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYWIPWT (SEQ ID NO: 22), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos VSYYYGIDL (SEQ ID NO: 23).

15 Se describe en la presente un anticuerpo anti-PD-1 madurado (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1, 711D) que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (LC) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVTTNAVA (SEQ ID NO: 24); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (SEQ ID NO: 10); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYTIPWT (SEQ ID NO: 11), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (HC) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos SSYYYGIDL (SEQ ID NO: 25).

20 25 En ciertas realizaciones, la sustitución o sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos no reducen sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, se pueden realizar alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporcionan en la presente) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión a PD-1. La afinidad de unión de las variantes de anticuerpos anti-PD-1 se puede valorar usando los métodos descritos en los Ejemplos siguientes.

30 35 Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 3 bajo el epígrafe "sustituciones conservadoras". En la Tabla 3 se proporcionan cambios más sustanciales bajo el encabezado de "sustituciones ejemplares", y como se describe más adelante en referencia a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y analizar los productos para determinar la actividad deseada, por ejemplo, la retención/mejora de la unión a PD-1, la disminución de la inmunogenicidad o la mejora de la ADCC o la CDC.

Tabla 3: Sustituciones conservadoras

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

40 45 Las sustituciones no conservadoras implicarán el cambio de un miembro de una de estas clases por otro de otra clase. Una variante sustitutiva ejemplar es un anticuerpo madurado por afinidad, que se puede generar convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración por afinidad basadas en el despliegue en fagos, tales como las descritas en la presente. En pocas palabras, se mutan uno o más residuos de las CDR y los anticuerpos variantes se despliegan en fagos y se analizan en busca de una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión). Se pueden realizar

- alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR (por sus siglas en inglés), por ejemplo, para mejorar la afinidad de los anticuerpos. Tales alteraciones se pueden producir en "puntos de hipermutabilidad" de las HVR, es decir, residuos codificados por codones que sufren mutaciones con alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), y/o SDR (a-CDR, por sus siglas en inglés), y se prueba la afinidad de unión de la variante VH o VL resultante. La maduración por afinidad por la construcción y reselección a partir de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., *Human Press*, Totowa, NJ, (2001)).
- En algunas divulgaciones de la maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para la maduración por cualquiera de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, barajado de cadenas o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, por sus siglas en inglés). Posteriormente se crea una biblioteca secundaria. Posteriormente, se examina la biblioteca para identificar cualquier variante de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad involucra enfoques dirigidos por las HVR, en los que se aleatorizan varios residuos de las HVR (por ejemplo, de 4 a 6 residuos a la vez). Los residuos de las HVR involucrados en la unión al antígeno se pueden identificar específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis de barrido de alanina o modelización. A menudo el objetivo son particularmente la CDR-H3 y la CDR-L3.
- Como se describe en la presente, el anticuerpo anti-PD-1 puede comprender una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (VL) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 21 y 24; (2) una CDR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o 16; (3) una CDR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 17, 22, y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12 o 18; (2) una CDR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o 19; y (3) una CDR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 14, 20, 23, y 25.
- Los dominios variables de la cadena pesada y ligera se pueden combinar en todas las combinaciones posibles por pares para generar una serie de anticuerpos anti-PD-1.
- El anticuerpo anti-PD-1 puede carecer de un motivo de N-glicosilación en la región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera, lo que puede causar diferencias dentro de un lote de anticuerpos que resulten en una alteración de la funcionalidad, la inmunogenicidad o la estabilidad. Los métodos de análisis de la glicosilación de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la cromatografía (tal como la cromatografía de intercambio catiónico (CEX, por sus siglas en inglés) o la cromatografía líquida), la espectrometría de masas (tal como la espectrometría de masas de ionización por electroaspersión) y la electroforesis capilar con sulfato de dodecilsodio. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Jung *et al.* (2011) *Curr Op Biotechnol.* 22(6): 858-67; Cummings RD, Etzler ME. *Antibodies and Lectins in Glycan Analysis.* en: Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, eds. *Essentials of Glycobiology.* 2º ed. Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press;* 2009. Capítulo 45; Mulloy B, Hart GW, Stanley P. *Structural Analysis of Glycans.* en: Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, eds. *Essentials of Glycobiology.* 2º ed. Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press;* 2009. Capítulo 47; Leymarie, *et al.* (2012) *Anal Chem.* 84(7): 3040-3048; Fernandez (2005) *European Biopharmaceutical Review.* pp 106-110; y Raju, T. (2013) *Methods Mol Biol.* 988: 169-180.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene una afinidad de unión más fuerte por un PD-1 que la que tiene por un homólogo de ese PD-1. Normalmente, el anticuerpo anti-PD-1 se "une específicamente" a PD-1 (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no mayor a aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, preferiblemente no mayor a aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M, y más preferiblemente no mayor a aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M) pero tiene una afinidad de unión por un miembro de la familia PD-1 que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces más débil que su afinidad de unión por PD-1. El anticuerpo anti-PD-1 que se une específicamente a PD-1 puede ser de cualquiera de los varios tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.
- En algunas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo anti-PD-1 a una proteína no objetivo es menor a aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo a PD-1, tal como se determina por métodos conocidos en la técnica, tales como ELISA, análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés) o radioinmunoprecipitación (RIA, por sus siglas en inglés). La unión específica se puede medir, por ejemplo, al determinar la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar por competencia con una molécula de control que sea similar al objetivo, por ejemplo, un exceso de objetivo no etiquetado. En este caso, la unión específica se indica si la unión del objetivo etiquetado a una sonda es inhibida competitivamente por un exceso de objetivo no etiquetado. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un objetivo polipeptídico particular como se usa en la presente se puede exhibir, por ejemplo, por una molécula que tiene una Kd para el objetivo de al menos aproximadamente  $10^{-4}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-5}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-6}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-7}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-8}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-9}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-10}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-11}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-12}$  M, o mayor. En una realización, el término

"unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítopo particular de un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítopo de polipéptido.

5 La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos contra las células tumorales. La ADCC es una defensa inmunitaria mediada por células por la que una célula efectora del sistema inmunitario lisan activamente una célula objetivo (por ejemplo, una célula cancerosa), cuyos antígenos de superficie de membrana han sido unidos por anticuerpos específicos (por ejemplo, tal como un anticuerpo anti PD-1 descrito en la presente). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 exhibe una función efectora de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) similar a la de OPDIVO® o Nivolumab, como demuestran, por 10 ejemplo, los ensayos descritos en el Ejemplo.

15 Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la actividad de la función efectora de ADCC de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es de al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos 20 aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos 25 aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 100 %, o mayor a 100 % (por ejemplo, aproximadamente 105 %, aproximadamente 106 %, aproximadamente 107 %, aproximadamente 108 %, aproximadamente 109 %, aproximadamente 110 %, aproximadamente 111 %, aproximadamente 112 %, aproximadamente 113 %, aproximadamente 114 %, aproximadamente 115 %, aproximadamente 116 %, aproximadamente 117 %, aproximadamente 118 %, aproximadamente 119 %, aproximadamente 120 %, aproximadamente 121 %, aproximadamente 122 %, aproximadamente 123 %, aproximadamente 124 %, 30 aproximadamente 125 %, o aproximadamente 130 %) de la actividad de la función efectora ADCC de OPDIVO® (Nivolumab), incluyendo cualquier rango entre estos valores.

25 35 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 presenta una afinidad de unión a PD-1 similar a la de OPDIVO®. En ciertas realizaciones, la unión a PD-1 se demuestra por ELISA, como se describe en los Ejemplos. Por ejemplo, la afinidad de unión del anti-PD-1 para PD-1 es aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, 40 aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, 45 aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, o mayor a 100 % (por ejemplo, aproximadamente 105 %, aproximadamente 106 %, aproximadamente 107 %, aproximadamente 108 %, aproximadamente 109 %, aproximadamente 110 %, aproximadamente 111 %, aproximadamente 112 %, aproximadamente 113 %, aproximadamente 114 %, aproximadamente 115 %, aproximadamente 116 %, aproximadamente 117 %, 50 aproximadamente 118 %, aproximadamente 119 %, aproximadamente 120 %, aproximadamente 121 %, aproximadamente 122 %, aproximadamente 123 %, aproximadamente 124 %, aproximadamente 125 %, o más de aproximadamente 125 %) que la afinidad de unión de OPDIVO® (Nivolumab) por PD-1.

40 55 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se une a un PD-1 humano con una Kd entre aproximadamente 0,1 pM a 200 pM (0,2 nM), por ejemplo, aproximadamente 0,1 pM, aproximadamente 0,25 pM, aproximadamente 0,5 pM, 50 aproximadamente 0,75 pM, aproximadamente 1 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 30 pM, aproximadamente 40 pM, aproximadamente 50 pM, aproximadamente 60 pM, aproximadamente 70 pM, aproximadamente 80 pM, aproximadamente 90 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 110 pM, aproximadamente 120 pM, aproximadamente 130 pM, aproximadamente 140 pM, 55 aproximadamente 150 pM, aproximadamente 160 pM, aproximadamente 170 pM, aproximadamente 180 pM, aproximadamente 190 pM, o más de aproximadamente 190 pM, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, la afinidad de unión del anticuerpo anti-PD-1 a PD-1 es de aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, 60 aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 % o mayor de aproximadamente 100 % (por ejemplo, aproximadamente 105 %, aproximadamente 110 %, aproximadamente 120 % o aproximadamente 130 %) que la afinidad de unión de OPDIVO® (Nivolumab) a PD-1. En ciertas realizaciones, la afinidad de unión del anti-PD-1 a PD-1 es de aproximadamente 1,1 veces, aproximadamente 1,2 veces, aproximadamente 1,3 veces, aproximadamente 1,4 veces, aproximadamente 1,5 veces, 65 aproximadamente 1,6 veces, aproximadamente 1,7 veces, aproximadamente 1,8 veces, aproximadamente 1,9 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,25 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,75 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,25 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 3,75 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4,25 veces, aproximadamente 4,5 veces, aproximadamente 4,75 veces, o mayor de aproximadamente 4,75 veces más a la afinidad de unión de OPDIVO® (Nivolumab) a PD-1, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 proporcionados en la presente tienen vidas medias *in vivo* prolongadas en comparación con OPDIVO®. En ciertas realizaciones, la vida media *in vivo* de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente no es menor a la vida media *in vivo* de OPDIVO®.

65 En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 proporcionados en la presente presentan propiedades

farmacocinéticas similares a las de OPDIVO® (Nivolumab) o su bioequivalente. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 proporcionados en la presente exhiben un ABC (área bajo la curva) que es de aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o mayor a 95 % (tal como aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o mayor a 99 %) de los perfiles de concentración sérica-tiempo de OPDIVO® (Nivolumab) o su bioequivalente, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo comprende una secuencia Fc de una IgG humana, por ejemplo, IgG1 humana o IgG4 humana. En ciertas realizaciones, la secuencia Fc ha sido alterada o modificada de otro modo de modo que carece de la función efectora de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), a menudo relacionada con su unión a los receptores Fc (FcR). Hay muchos ejemplos de cambios o mutaciones en las secuencias Fc que pueden alterar la función de los efectores. Por ejemplo, WO 00/42072 y Shields *et al.* *J Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001) describe variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a los FcR. El anticuerpo puede tener la forma de un Fab, Fab', un F(ab)'2, Fv de cadena única (scFv), un fragmento Fv; un diacuerpo y un anticuerpo lineal. Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo multiespecífico que se une a PD-1, pero también se une a otro u otros objetivos e inhibe su funcionalidad. El anticuerpo se puede conjugar con un agente terapéutico (por ejemplo, agente citotóxico, un radioisótopo y un agente quimioterapéutico) o una etiqueta para detectar PD-1 en muestras de pacientes o *in vivo* por imagenología (por ejemplo, radioisótopo, tinte fluorescente y enzima). Otras modificaciones incluyen la conjugación de toxinas con los anticuerpos anti-PD-1 proporcionados en la presente.

También se contemplan las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-PD-1, los vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente, y las células que comprenden las moléculas de ácido nucleico. Estos anticuerpos se pueden usar en las terapias descritas en la presente y para detectar la proteína PD-1 en muestras de pacientes (por ejemplo, mediante ensayos FACS, inmunohistoquímica (IHC), ELISA) o en pacientes.

#### Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) o se pueden fabricar por métodos de ADN recombinante (patente de EE.UU. No. 4,816,567) o se pueden producir por los métodos descritos tal como se describen en la presente en los Ejemplos que se muestran a continuación. En un método de hibridoma, un hámster, ratón u otro animal hospedero apropiado se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá típicamente un polipéptido o una proteína de fusión de la proteína de interés o una composición que comprenda la proteína. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL", por sus siglas en inglés) si se desean células de origen humano, o células de bazo o de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan posteriormente con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles And Practice*, Nueva York: Academic Press, 1986, pp. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas son usualmente células transformadas de mamíferos, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Usualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente con una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HPRT o HPRT, por sus siglas en inglés), el medio de cultivo de los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT", por sus siglas en inglés), sustancias que previenen el crecimiento de las células deficientes en HPRT.

Preferiblemente, las líneas celulares inmortalizadas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan una expresión estable de alto nivel de anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de ratón-heteromieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.* *Monoclonal Antibody Production Techniques And Applications*, Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, 1987, pp. 51-63).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede ensayar posteriormente para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se puede determinar por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson and Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

Una vez identificadas las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitante y cultivar por métodos estándar. Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco y el medio RPMI-1640 (por su nombre en inglés). Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

- 5 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o del líquido de ascitis por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
- 10 Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de EE.UU. No. 4,816,567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales proporcionados en la presente se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma proporcionadas en la presente sirven preferiblemente como fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que posteriormente se transfectan en células hospedadoras, tales como células de simio COS (por sus siglas en inglés), células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que, por lo demás, no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. No. 4,816,567; Morrison *et al.*, *supra*) o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. Tal polipéptido no inmunoglobulínico se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo proporcionado en la presente, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígenos de un anticuerpo proporcionado en la presente para crear un anticuerpo bivalente químérico.
- 15 25 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 proporcionado por la invención es expresado por una línea celular de mamífero estable. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 proporcionado por la invención se expresa a partir de una línea celular de mamífero estable a un título de aproximadamente 2,0 gramos/litro, aproximadamente 2,5 gramos/litro, aproximadamente 3,0 gramos/litro, aproximadamente 3,5 gramos/litro, aproximadamente 4,0 gramos/litro, aproximadamente 4,5 gramos/litro, aproximadamente 5,0 gramos/litro, aproximadamente 5,5 gramos/litro, aproximadamente 6 gramos/litro, aproximadamente 6,5 gramos/litro, aproximadamente 7,0 gramos/litro, o más de aproximadamente 7,0 gramos/litro, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, la línea celular de mamífero estable a partir de la cual se expresa un anticuerpo anti-PD-1 proporcionado por la invención es una línea celular CHO.
- 20 30 35 En ciertas realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método involucra la expresión recombinante de la cadena ligera de inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región Fc para prevenir la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se delecionan para prevenir el reticulado.
- 40 45 Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, se puede llevar a cabo usando, pero no se limitan a, técnicas conocidas en la técnica.
- 50 Anticuerpos humanos y humanizados
- 55 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que típicamente contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una CDR del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado preferiblemente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Jones *et al.* *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).
- 60 65 Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que típicamente son tomados de un dominio variable de "importación". De acuerdo con una realización, la

- humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones *et al.* *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.* *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.* *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), por la sustitución de las secuencias de CDR o CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos (patente de EE.UU. No. 4,816,567), en 5 donde se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos de las FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.
- 10 Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpos (JH, por sus siglas en inglés) en ratones químicos y mutantes germinales resulta en una inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos.
- 15 La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulinas de línea germinal humana a tales ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras la provocación con antígenos. Ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.* *PNAS USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann *et al.* *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); patentes de EE.UU. No. 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669; 5,545,807; y WO 97/17852.
- 20 Alternativamente, los anticuerpos humanos se pueden fabricar al introducir *loci* de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o totalmente. Tras el reto, se observa una producción de anticuerpos humanos muy parecida a la observada en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización genética, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016, y en Marks *et al.* 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.* *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).
- 25 Alternativamente, se puede usar la tecnología de despliegue en fagos (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553, 1990) para producir *in vitro* anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donadores no inmunizados. De acuerdo con una realización de esta técnica, las secuencias del dominio V del anticuerpo se clonian en marco en un gen de proteína de recubrimiento mayor o menor de un bacteriófago filamento, tal como M13 o fd, y se despliegan como fragmentos funcionales de anticuerpo en la superficie de la partícula del fago. El despliegue en fagos se puede realizar en varios formatos, por ejemplo, como se describe más adelante en la sección Ejemplos o como se revisa en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para el despliegue de fagos. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) aisieron un conjunto vario de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donadores humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra una serie varia de antígenos (incluidos los autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). Ver también las patentes de EE.UU. No. 5,565,332 y 5,573,905.
- 30 Como se ha comentado anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden ser generados por células B activadas *in vitro* (ver las patentes de EE.UU. No. 5,567,610 y 5,229,275).
- 35 Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluidas las bibliotecas de despliegue en fagos. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991). Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos. Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991).
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Anticuerpos multiespecíficos
- Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para dos o más antígenos diferentes (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos). Por ejemplo, una de las especificidades de unión puede ser para la proteína a5~1, la otra puede ser para cualquier otro antígeno. De acuerdo con una realización preferida, el otro antígeno es una proteína de la superficie celular o un receptor o subunidad de receptor. Por ejemplo, la proteína de superficie celular puede ser un receptor de células asesinas naturales (NK). Así, de acuerdo con una realización, un anticuerpo biespecífico de esta invención se puede unir tanto a PD-1 como, por ejemplo, a un segundo receptor de superficie celular.
- Los métodos adecuados para fabricar anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de inmunoglobulinas de cadena pesada/cadena ligera, en donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes. Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983). Debido a la distribución aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos

hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial a menudo diferente de moléculas de anticuerpos, de las cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza usualmente por pasos de extracción por cromatografía de afinidad. Algunos procedimientos similares se divultan en WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, *EMBO*, 10: 3655-3659 (1991).

5 Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para 10 la unión de la cadena ligera esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfieren en un organismo hospedero adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

15 10 20 25 30 También se han descrito varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelnik *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun (por sus siglas en inglés) se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y posteriormente se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede usar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *PNAS USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un VH conectado a un VL por un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se ven obligados a emparejarse con los dominios complementarios VL y VH de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígenos. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos usando dímeros de Fv de cadena única (sFv). Ver Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

35 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

#### Anticuerpos heteroconjungados

35 Los anticuerpos heteroconjungados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE.UU. No. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección por VIH. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089. Se contempla que los anticuerpos se puedan preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo los que involucran agentes reticulantes. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando una unión de tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 40 metil-4-mercaptopbutirimato y los divulgados, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 4,676,980.

#### Ingeniería de la función de los efectores

45 Puede ser deseable modificar el anticuerpo proporcionado en la presente con respecto a la función efectora, con el fin de potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se pueden introducir residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de un puente disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la destrucción celular mediada por complemento y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Ver, Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176: 1191- 1195 (1992) y Shapes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también se pueden preparar usando enlazadores cruzados heterobifuncionales, como se describe en Wolff *et al.*, *Cancer Research*, 53., 2003: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede crear un anticuerpo genetecnológico que tenga dos regiones Fc y por lo mismo potenciar las capacidades de lisis del complemento y ADCC. Ver, Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989).

55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 Se pueden realizar mutaciones o alteraciones en las secuencias de la región Fc para mejorar la unión al FcR (por ejemplo, FcγR, FcRn). De acuerdo con una realización, un anticuerpo de esta invención tiene al menos una función efectora alterada seleccionada del grupo que consiste en ADCC, CDC, y unión FcRn mejorada en comparación con una IgG nativa o un anticuerpo parental. Se describen ejemplos de varias mutaciones específicas útiles en, por ejemplo, Shields, RL *et al.* (2001) *JBC* 276(6):6591-6604; Presta, L.G., (2002) *Biochemical Society Transactions* 30(4): 487-490; y WO 00/42072.

De acuerdo con una realización, la mutación del receptor Fc es una sustitución en al menos una posición seleccionada del grupo que consiste en: 238, 239, 246, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439 de la región Fc, en donde la numeración de los residuos de la región Fc es conforme al sistema de numeración de EU. En algunas realizaciones, la mutación del receptor Fc es una sustitución D265A. En algunas realizaciones, la

mutación del receptor Fc es una sustitución N297A. En la patente de EE.UU. No. 7,332,581 se exponen adicionalmente otras mutaciones adecuadas.

5 Inmunoconjungados

La invención también se refiere a inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjungado).

10 Las toxinas enzimáticamente activas y sus fragmentos que se pueden usar incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos no vinculantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la  $\alpha$ -sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S, por sus siglas en inglés, respectivamente), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, 15 fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Existen varios radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjungados. Algunos ejemplos incluyen 212Bi, 131I, 131In, 90Y y 186Re. Los agentes quimioterapéuticos ejemplares útiles en la generación de tales inmunoconjungados incluyen los descritos en otra parte de la presente.

20 En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 proporcionado en la presente se conjuga con maytansina, un maytansinoide o calicheamicina. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 proporcionado en la presente se conjuga con el maytansinoide DM1.

25 Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se realizan usando una variedad de agentes bifuncionales de acoplamiento de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de dimetiladipimidato), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(*p*-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bisdiazonio (tales como bis-(*p*-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El 30 ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA, por sus siglas en inglés) etiquetado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo. Ver, WO94/11026.

35 En otra forma de realización, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como la estreptavidina) para usarlo en la preselección tumoral, en donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de limpieza y, posteriormente, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Modificaciones covalentes

40 Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-PD-1 y sus fragmentos se incluyen en el ámbito de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos objetivo de un polipéptido con un agente derivatizante orgánico capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N- o C-terminales del polipéptido. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular el polipéptido a una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para usarlo en el método de purificación de anticuerpos, y viceversa. Los agentes reticulantes comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo, tales como el 3,3'-ditriobis-(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(*p*-azidofenil)-ditio]propioimidato.

50 Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos de glutamilo y asparatilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

55 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido comprende el enlace del polipéptido a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG, por sus siglas en inglés), polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de EE.UU. No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192, o 4,179,337.

60 Moléculas químéricas

Un anticuerpo anti-PD-1, y/o fragmento del mismo, de la presente invención también se puede modificar si es ventajoso de manera que forme una molécula químérica que comprenda el polipéptido fusionado a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos (por ejemplo, inmunoadhesinas o pepticuerpos).

5

En una realización, tal molécula químérica comprende una fusión del polipéptido con un dominio de transducción de proteínas que tiene como objetivo el suministro del polipéptido a varios tejidos y, más particularmente, a través de la barrera hematoencefálica, usando, por ejemplo, el dominio de transducción de proteínas de la proteína TAT (por sus siglas en inglés) del virus de la inmunodeficiencia humana (Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285: 1569-72).

10

15

20

En otra realización, dicha molécula químérica comprende una fusión del polipéptido con un polipéptido de etiqueta que proporciona un epítopo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etageta. La etiqueta epítópica generalmente se coloca en el amino o carboxilo terminal del polipéptido. La presencia de tales formas del polipéptido etiquetadas con epítopos se puede detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido etiquetado. Además, proporcionar la etiqueta epítópica permite purificar fácilmente el polipéptido por purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-etageta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta epítópica. En la técnica se conocen varios polipéptidos de etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Algunos ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-His) o poli-histidina-glicina (poli-His-gly); el polipéptido de la etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)); y la etiqueta de la glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3(6): 547-553 (1990)); (por sus siglas en inglés, respectivamente). Otros polipéptidos de etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)); el péptido epítopo KT3 (Martin *et al.*, *Science*, 255:192-194 (1992)); un péptido epítopo de  $\alpha$ -tubulina (Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:15163- 15166 (1991)); y la etiqueta peptídica de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)); (por sus siglas en inglés, respectivamente).

25

En una realización alternativa, la molécula químérica puede comprender una fusión del polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula químérica (por ejemplo, una "inmunoadhesina"), tal fusión podría ser a la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones de Ig de esta invención incluyen polipéptidos que comprenden aproximadamente o solamente los residuos 94-243, los residuos 33-53 o los residuos 33-52 de humano en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulinas incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, ver también la patente de EE.UU. No. 5,428,130, emitida el 27 de junio de 1995.

30

#### Inmunoliposomas

35

Los anticuerpos divulgados en la presente también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, *PNAS USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *PNAS USA*, 77: 4030 (1980); y las patentes de EE.UU. No. 4,485,045 y 4,544,545. En la patente de EE.UU. No. 5,013,556 se divulan liposomas con un tiempo de circulación potenciado.

45

Se pueden generar liposomas particularmente útiles por el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE, por sus siglas en inglés). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, el liposoma también contiene un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento o un agente quimioterapéutico (tal como la doxorubicina). Ver, Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

50

#### Tratamiento usando anticuerpos anti-PD-1

55

Las composiciones proporcionadas en la presente se pueden administrar a sujetos (por ejemplo, mamíferos tales como seres humanos) para tratar enfermedades y trastornos que involucran actividad anormal de PD-1, incluyendo, por ejemplo, cáncer (tal como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, etc.). Se divulan los anticuerpos anti PD-1 descritos en la presente (o fragmentos de los mismos) para su uso en el tratamiento del cáncer (tal como melanoma, NSCLC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B de linfoma no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón), cáncer de esófago, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer del tracto biliar, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides) en un sujeto.

60

65

En ciertas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-PD-1 proporcionado en la presente para su uso en el tratamiento del cáncer (melanoma, NSCLC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B de linfoma no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón), cáncer de esófago, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer del tracto biliar, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides) en un sujeto. En ciertas realizaciones, el sujeto a tratar es un mamífero (por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, una rata, un ratón, una vaca, un caballo, un cerdo, una oveja, una cabra, un perro, un gato, etc.). En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un paciente clínico, un voluntario de un ensayo clínico, un animal de

experimentación, etc. En ciertas realizaciones, se sospecha que el sujeto padece o está en riesgo de padecer un cáncer (tal como melanoma, NSCLC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón), cáncer de esófago, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer del tracto biliar, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides) o ser diagnosticado de un cáncer o cualquier otra enfermedad que tenga una expresión o actividad anormal de PD-1.

5

10 Muchos métodos de diagnóstico del cáncer (tal como melanoma, NSCLC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B de linfoma no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón), cáncer de esófago, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer del tracto biliar, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides) o cualquier otra enfermedad que presente una actividad anormal de PD-1 y la delimitación clínica de dichas enfermedades son conocidas en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, inmunohistoquímica, PCR, hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés). Detalles adicionales sobre los métodos de diagnóstico de la actividad o expresión anómala de PD-1 se describen, por ejemplo, en Gupta *et al.* (2009) *Mod Pathol.* 22(1): 128-133; López-Ríos *et al.* (2013) *J Clin Pathol.* 66(5): 381-385; Ellison *et al.* (2013) *J Clin Pathol.* 66(2): 79-89; y Guha *et al.* (2013) *PLoS ONE* 8(6): e67782.

15

20 La administración se puede realizar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, intravenosa, intramuscular o subcutánea. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 (o fragmentos de los mismos) y/o las composiciones proporcionados en la presente se administran en combinación con un segundo, tercer o cuarto agente (incluyendo, por ejemplo, un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico) para tratar las enfermedades o trastornos que involucran una actividad anormal de PD-1. Tales agentes incluyen, por ejemplo, docetaxel, gefitinib, FOLFIRI (irinotecán, 5-fluorouracilo y leucovorina, por sus siglas en inglés), irinotecán, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab (anticuerpo anti-VEGF), FOLFOX-4, fluorouracilo infusional, leucovorina, y oxaliplatino, afatinib, gemcitabina, capecitabina, pemetrexed, tivantinib, everolímus, CpG-ODN, rapamicina, lenalidomida, vemurafenib, endostatina, lapatinib, PX-866, Imprime PGG, e irlotinibm. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 (o fragmentos de los mismos) se conjugan con el agente adicional.

25

30 Las composiciones proporcionadas en la presente se pueden administrar en combinación con una o más terapias adicionales, tales como radioterapia, cirugía, quimioterapia y/o terapia dirigida. En ciertas realizaciones, las composiciones proporcionadas en la presente se administran en combinación con radioterapia. En ciertas realizaciones, la combinación de una composición proporcionada en la presente y radioterapia se usa para tratar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en melanoma, NSCLC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B de linfoma no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón), cáncer de esófago, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer de vías biliares, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, y cáncer de tiroides.

35

40 Dependiendo de la indicación a tratar y de los factores relevantes para la dosificación con los que un médico experto en la materia estaría familiarizado, los anticuerpos anti-PD-1, proporcionados en la presente se administrarán a una dosis que sea eficaz para el tratamiento de dicha indicación, minimizando al mismo tiempo la toxicidad y los efectos secundarios. Para el tratamiento de un cáncer (tal como melanoma, NSCLC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B de linfoma no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón), cáncer de esófago, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer del tracto biliar, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides), una dosis típicamente es, por ejemplo, del orden de 0,001 a 1000 µg; sin embargo, las dosis por debajo o por encima de este rango ejemplar están dentro del alcance de la invención. La dosis diaria puede ser de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal total (por ejemplo, aproximadamente 5 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, o un rango definido por dos de los valores anteriores), preferiblemente de aproximadamente 0,3 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal total (por ejemplo, aproximadamente 0,5 µg/kg, aproximadamente 1 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 150 µg/kg, aproximadamente 300 µg/kg, aproximadamente 750 µg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, o un rango definido por dos de los valores anteriores), más preferiblemente de aproximadamente 1 µg/kg a 1 mg/kg de peso corporal total (por ejemplo, aproximadamente 3 µg/kg, aproximadamente 15 µg/kg, aproximadamente 75 µg/kg, aproximadamente 300 µg/kg, aproximadamente 900 µg/kg, o un rango definido por dos de los valores anteriores), y aún más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal al día (por ejemplo, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, o un rango definido por dos de los valores anteriores, incluyendo cualquier rango entre los valores anteriores). Como ya se ha señalado, la eficacia terapéutica o profiláctica se puede controlar por la valoración periódica de los pacientes tratados. Para administraciones repetidas por varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se repite hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles y están dentro del alcance de la invención. La dosis deseada se puede administrar por una única administración en bolo de la composición, por múltiples administraciones en bolo de la composición, o por una

45

50

55

60

65

administración en infusión continua de la composición.

Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar una, dos, tres o cuatro veces al día. Las composiciones también se pueden administrar con menor frecuencia que a diario, por ejemplo, seis veces a la semana, cinco veces a la semana, cuatro veces a la semana, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, o una vez cada seis meses. Las composiciones también se pueden administrar en una formulación de liberación sostenida, tal como en un implante que libera gradualmente la composición para su uso por un periodo de tiempo, y que permite que la composición se administre con menos frecuencia, tal como una vez al mes, una vez cada 2-6 meses, una vez al año, o incluso una única administración. Los dispositivos de liberación sostenida (tales como gránulos, nanopartículas, micropartículas, nanoesferas, microesferas y similares) se pueden administrar por inyección.

El anticuerpo se puede administrar en una dosis diaria única, o la dosis diaria total se puede administrar en dosis divididas de dos, tres o cuatro veces al día. Las composiciones también se pueden administrar con menor frecuencia que a diario, por ejemplo, seis veces a la semana, cinco veces a la semana, cuatro veces a la semana, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, o una vez cada seis meses. El anticuerpo también se puede administrar en una formulación de liberación sostenida, tal como en un implante que libera gradualmente la composición para su uso por un periodo de tiempo, y que permite que la composición se administre con menos frecuencia, tal como una vez al mes, una vez cada 2-6 meses, una vez al año, o incluso una única administración. Los dispositivos de liberación sostenida (tales como gránulos, nanopartículas, micropartículas, nanoesferas, microesferas y similares) se pueden administrar por inyección o implantar quirúrgicamente en varias ubicaciones.

Los tratamientos contra el cáncer se pueden evaluar, por ejemplo, pero no se limitan a, la regresión tumoral, la reducción del peso o tamaño del tumor, el tiempo hasta la progresión, la duración de la supervivencia, la supervivencia libre de progresión, la tasa de respuesta global, la duración de la respuesta, la calidad de vida, la expresión y/o actividad de las proteínas. Se pueden emplear métodos para determinar la eficacia de la terapia, incluyendo, por ejemplo, la medición de la respuesta a través de imágenes radiológicas.

En algunas realizaciones, la eficacia del tratamiento se mide como el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (%) de TGI, por sus siglas en inglés), calculado usando la ecuación  $100 - (T/C \times 100)$ , en donde T es el volumen del tumor relativo medio del tumor tratado, y C es el volumen del tumor relativo medio de un tumor no tratado. En ciertas realizaciones, el % de TGI es de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, o mayor a 95 %. En ciertas realizaciones, el % de TGI de un anti-PD-1 es igual o mayor a el % de TGI de OPDIVO®, tal como aproximadamente 1,1 veces, aproximadamente 1,2 veces, aproximadamente 1,3 veces, aproximadamente 1,4 veces, aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 1,6 veces, aproximadamente 1,7 veces, aproximadamente 1,8 veces, aproximadamente 1,9 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,1 veces, aproximadamente 2,2 veces, aproximadamente 2,3 veces, aproximadamente 2,4 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 2,6 veces, aproximadamente 2,7 veces, incluyendo cualquier rango entre estos valores, o mayor a aproximadamente 2,7 veces el % de TGI de OPDIVO®.

#### Formulaciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-PD-1 se pueden formular con portadores o excipientes adecuados para que sean adecuados para su administración. Las formulaciones adecuadas de los anticuerpos se obtienen mezclando un anticuerpo (o fragmento del mismo) que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> ed, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores, tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o benzílico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y *m*-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de unos 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como olivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, tales como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA (por sus siglas en inglés); azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ (por sus nombres en inglés, respectivamente) o polietilenglicol (PEG). En WO98/56418 se describen formulaciones de anticuerpos ejemplares. En WO97/04801 se describen formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea. Tales formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir con un diluyente adecuado hasta alcanzar una concentración elevada de proteínas, y la formulación reconstituida se puede administrar por vía subcutánea al mamífero que vaya a ser tratado en la presente.

La formulación en la presente también puede contener más de un compuesto activo como sea necesario para la indicación

particular que se esté tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente antineoplásico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico. Tales moléculas están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el fin previsto. La cantidad efectiva de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, del tipo de enfermedad o trastorno o del tratamiento, y de otros factores comentados anteriormente. Generalmente se usan en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describe en la presente o aproximadamente entre 1 y 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora. Los principios activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divultan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>o</sup> ed, Osol, A. Ed. (1980). Se pueden preparar 5 preparados de liberación prolongada. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el antagonista, matrices que se presentan en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen 10 poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE.UU. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etilvinileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico y ácido glicólico, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de 15 ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

20 Las lipofectinas o liposomas se pueden usar para administrar los polipéptidos y anticuerpos (o fragmentos de los mismos) o las composiciones de esta invención en las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína objetivo. Por ejemplo, basados en 25 las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína objetivo. Tales péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir por tecnología de ADN recombinante. Ver, por ejemplo, Marasco *et al.*, *PNAS USA*, 90: 7889-7893 (1993).

30 Los principios activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divultan en Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

35 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen el anticuerpo (o fragmento del mismo), matrices que se presentan en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Algunos ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de EE.UU. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tal como el LUPRON 40 DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli-D(-)-3-ácido hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como el etilvinilacetato y el ácido láctico-glicólico permiten la liberación de moléculas por más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas por períodos más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo por mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que resulta en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios 45 en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales de estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de uniones S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr al modificar los residuos de sulfhidrilo, al liofilizar a partir de soluciones ácidas, al controlar el contenido de humedad, al usar aditivos apropiados y al desarrollar composiciones de matriz polimérica específicas.

50 En ciertas realizaciones, la formulación comprende un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente a una concentración mayor a aproximadamente 0,5 mg/mL, mayor a aproximadamente 1 mg/mL, mayor a aproximadamente 2 mg/mL, mayor a aproximadamente 3 mg/mL, mayor a aproximadamente 4 mg/mL, mayor a aproximadamente 5 mg/mL, mayor a aproximadamente 6 mg/mL, mayor a aproximadamente 7 mg/mL, mayor a aproximadamente 8 mg/mL, mayor a aproximadamente 9 mg/mL, mayor a aproximadamente 10 mg/mL, mayor a aproximadamente 11 mg/mL, mayor a aproximadamente 12 mg/mL, mayor a aproximadamente 13 mg/mL, mayor a aproximadamente 14 mg/mL, mayor a aproximadamente 15 mg/mL, mayor a aproximadamente 16 mg/mL, mayor a aproximadamente 17 mg/mL, mayor a aproximadamente 18 mg/mL, mayor a aproximadamente 19 mg/mL, mayor a aproximadamente 20 mg/mL, mayor a aproximadamente 21 mg/mL, mayor a aproximadamente 22 mg/mL, mayor a aproximadamente 23 mg/mL, mayor a aproximadamente 24 mg/mL, mayor a aproximadamente 25 mg/mL, mayor a aproximadamente 26 mg/mL, mayor a aproximadamente 27 mg/mL, mayor a aproximadamente 28 mg/mL, mayor a aproximadamente 29 mg/mL, o mayor a aproximadamente 30 mg/mL, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

55 En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se formula (por ejemplo, a una concentración mayor a aproximadamente 0,5 mg/mL, mayor a aproximadamente 1 mg/mL, mayor a aproximadamente 5 mg/mL, mayor a aproximadamente 10 mg/mL, mayor a aproximadamente 15 mg/mL, mayor a aproximadamente 20 mg/mL, o mayor a aproximadamente 25

mg/mL, incluyendo cualquier rango entre estos valores) en un amortiguador que incluye citrato, NaCl, acetato, succinato, glicina, polisorbato 80 (Tween 80), o cualquier combinación de los anteriores. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se formula (por ejemplo, a una concentración mayor a aproximadamente 0,5 mg/mL, mayor a aproximadamente 1 mg/mL, mayor a aproximadamente 5 mg/mL, mayor a aproximadamente 10 mg/mL, mayor a aproximadamente 15 mg/mL, mayor a aproximadamente 20 mg/mL, o mayor a aproximadamente 25 mg/mL, incluyendo cualquier rango entre estos valores) en un amortiguador que incluye aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM de glicina. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se formula en un amortiguador que comprende aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM de NaCl. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se formula (por ejemplo, a una concentración mayor a aproximadamente mg/mL, mayor a aproximadamente 1 mg/mL, mayor a aproximadamente 5 mg/mL, mayor a aproximadamente 10 mg/mL, mayor a aproximadamente 15 mg/mL, mayor a aproximadamente 20 mg/mL, o mayor a aproximadamente 25 mg/mL, incluyendo cualquier rango entre estos valores) en un amortiguador que comprende aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de acetato. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se formula en un amortiguador que comprende de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de succinato. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se formula (por ejemplo, a una concentración mayor de aproximadamente 0,5 mg/mL, mayor de aproximadamente 1 mg/mL, mayor de aproximadamente 5 mg/mL, mayor de aproximadamente 10 mg/mL, mayor de aproximadamente 15 mg/mL, mayor de aproximadamente 20 mg/mL, o mayor de aproximadamente 25 mg/mL, incluyendo cualquier rango entre estos valores) en un amortiguador que incluye aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,02 % de polisorbato 80. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se formula en un amortiguador que tiene un pH entre aproximadamente 5,1 y 5,6. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se formula en un amortiguador que comprende 10 mM de citrato, 100 mM de NaCl, 100 mM de glicina, y polisorbato 80 al 0,01 %, en donde la formulación está a pH = 5,5.

En ciertas realizaciones, una formulación (tal como una formulación que comprende un amortiguador que comprende 10 mM de citrato, 100 mM de NaCl, 100 mM de glicina, y polisorbato 80 al 0,01 %, en donde la formulación está a pH = 5,5) que comprende un anticuerpo PD-1 descrito en la presente (por ejemplo, a una concentración mayor a aproximadamente 0,5 mg/mL, mayor a aproximadamente 1 mg/mL, mayor a aproximadamente 5 mg/mL, mayor a aproximadamente 10 mg/mL, mayor a aproximadamente 15 mg/mL, mayor a aproximadamente 20 mg/mL, o mayor a aproximadamente 25 mg/mL, incluyendo cualquier rango entre estos valores) es estable a temperatura ambiente (tal como a aproximadamente 20-25 °C por aproximadamente 0,5 semanas, 1,0 semanas, 1,5 semanas, 2,0 semanas, 2,5 semanas, 3,5 semanas, 4,0 semanas, 4,5 semanas o 5,0 semanas, incluyendo cualquier rango entre estos valores). En ciertas realizaciones, una formulación (tal como una formulación que comprende un amortiguador que comprende 10 mM de citrato, 100 mM de NaCl, 100 mM de glicina, y polisorbato 80 al 0,01 %, en donde la formulación está a pH = 5,5) que comprende un anticuerpo PD-1 descrito en la presente (por ejemplo, a una concentración mayor a aproximadamente 0,5 mg/mL, mayor a aproximadamente 1 mg/mL, mayor a aproximadamente 5 mg/mL, mayor a aproximadamente 10 mg/mL, mayor a aproximadamente 15 mg/mL, mayor a aproximadamente 20 mg/mL, o mayor a aproximadamente 25 mg/mL, incluyendo cualquier rango entre estos valores) es estable bajo condiciones aceleradas (tales como almacenamiento a aproximadamente 37 °C) por aproximadamente 0,5 semanas, 1,0 semanas, 1,5 semanas, 2,0 semanas, 2,5 semanas, 3,5 semanas, 4,0 semanas, 4,5 semanas o 5,0 semanas, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) es un método muy conocido y ampliamente usado en los estudios de estabilidad de proteínas para detectar posibles fragmentaciones y agregaciones, correspondientes a inestabilidades físicas y químicas. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente muestra menos de aproximadamente 1,6 %, 1,4 %, 1,2 %, 1,0 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 %, o 0,1 % de aumento en especies de alto peso molecular (HMWS, por sus siglas en inglés) después de 1 semana a 37 °C, en relación con el % inicial de especies de alto peso molecular, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente muestra menos de aproximadamente 2,0 %, 1,8 %, 1,6 %, 1,4 %, 1,2 %, 1,0 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 %, o 0,1 % de aumento en especies de alto peso molecular después de 2 semanas a 37 °C, en relación con el % inicial de especies de alto peso molecular, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente muestra menos de aproximadamente 3,3 %, 3,2 %, 3,1 %, 3,0 %, 2,9 %, 2,8 %, 2,7 %, 2,6 %, 2,5 %, 2,4 %, 2,2 %, 2,0 %, 1,8 %, 1,6 %, 1,4 %, 1,2 %, 1,0 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 %, o 0,1 % de aumento de especies de alto peso molecular después de 4 semanas a 37 °C, en relación con el % inicial de especies de alto peso molecular, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente muestra menos de aproximadamente 1,6 %, 1,4 %, 1,2 %, 1,0 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 %, o 0,1 % de aumento en especies de bajo peso molecular (LMWS, por sus siglas en inglés) después de 1 semana a 37 °C, en relación con el % inicial de especies de bajo peso molecular, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente muestra menos de aproximadamente 2,0 %, 1,8 %, 1,6 %, 1,4 %, 1,2 %, 1,0 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 %, o 0,1 % de aumento en especies de bajo peso molecular después de 2 semanas a 37 °C, en relación con el % inicial de especies de bajo peso molecular, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente muestra menos de

aproximadamente 2,4 %, 2,2 %, 2,0 %, 1,8 %, 1,6 %, 1,4 %, 1,2 %, 1,0 %, 0,8 %, 0,6 %, 0,4 %, 0,2 % o 0,1 % de aumento en especies de bajo peso molecular después de 4 semanas a 37 °C, en relación con el % inicial de especies de bajo peso molecular, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

- 5 En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente muestra no mayor a aproximadamente 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,4 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 2 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3,0 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, o 3,5 % de disminución de monómero después de 1 semana a 37 °C, en relación con el % inicial de monómero, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente muestra no mayor a aproximadamente 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,4 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 2,0 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3,0 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, o 3,5 % de disminución de monómero después de 2 semanas a 37 °C, en relación con el % inicial de monómero, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente muestra no mayor a aproximadamente 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,4 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 2,0 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, 2,6 %, 2,7 %, 2,8 %, 2,9 %, 3,0 %, 3,1 %, 3,2 %, 3,3 %, 3,4 %, o 3,5 % de disminución de monómero después de 2 semanas a 37 °C, en relación con el % inicial de monómero, como se mide usando SEC, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

20 La cromatografía de intercambio catiónico (CEX) es una herramienta bien conocida y ampliamente usada para detectar eventos de degradación de proteínas tales como la desamidación o la oxidación (Moorhouse *et al.* (1997) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16, 593-603). Los productos de degradación típicamente son especies ácidas o básicas en comparación con los gnts con mayor *pI* aparente (por sus siglas en inglés). Las especies ácidas son las variantes que eluyen antes que el pico principal de CEX, mientras que las especies básicas son las variantes que eluyen después que el pico principal de CEX. En ciertas realizaciones, la fracción del pico ácido de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es no mayor a aproximadamente 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, o 15 % de la proteína total después de 1 semana a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, la fracción del pico ácido de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es no mayor a aproximadamente 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, o 18 % de la proteína total después de 2 semanas a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, la fracción del pico ácido de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-EFGR descrito en la presente es no mayor a aproximadamente 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, o 27 % de la proteína total después de 2 semanas a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

40 En ciertas realizaciones, la fracción del pico básico de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es no mayor a aproximadamente 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, o 46 % de la proteína total después de 1 semana a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, la fracción del pico básico de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es no mayor a aproximadamente 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, o 46 % de la proteína total después de 2 semanas a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, la fracción del pico básico de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es no mayor a aproximadamente 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, o 46 % de la proteína total después de 4 semanas a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

50 En ciertas realizaciones, la fracción del pico principal de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es no menor a aproximadamente 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, o 46 % de proteína total después de 1 semana a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, la fracción del pico básico de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es no menor a aproximadamente 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, o 46 % de proteína total después de 2 semanas a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores. En ciertas realizaciones, la fracción del pico básico de una formulación que comprende 5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL, 20 mg/mL, o 25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente es no menor a aproximadamente 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, o 46 % de proteína total después de 4 semanas a 37 °C, como se mide usando CEX, incluyendo cualquier rango entre estos valores.

60 Las formulaciones que se usen para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles.

65 Métodos de diagnóstico e imagenología usando anticuerpos anti-PD-1

5 Los anticuerpos anti-PD-1 etiquetados, sus fragmentos y sus derivados y análogos, que se unen específicamente a un polipéptido PD-1, se pueden usar con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar o monitorizar enfermedades y/o trastornos asociados con la expresión, expresión aberrante y/o actividad de PD-1. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-1 (o fragmentos de los mismos) proporcionados en la presente se pueden usar en ensayos de diagnóstico o de imagenología *in situ*, *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Los métodos para detectar la expresión de un polipéptido PD-1, comprenden (a) ensayar la expresión del polipéptido en células (por ejemplo, tejido) o fluido corporal de un individuo usando uno o más anticuerpos de esta invención y (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica estándar, por lo que un aumento o disminución en el nivel de expresión génica ensayado comparado con el nivel de expresión estándar es indicativo de expresión aberrante.

10 15 También se describe en la presente un método de diagnóstico de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o expresión aberrante de PD-1 en un animal (por ejemplo, un mamífero tal como un humano). Los métodos comprenden la detección de moléculas PD-1 en el mamífero. En ciertas realizaciones, el diagnóstico comprende: (a) administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-PD-1 etiquetado a un mamífero (b) esperar un intervalo de tiempo tras la 20 administración para permitir que el anticuerpo anti-PD-1 etiquetado se concentre preferentemente en los lugares del sujeto donde se expresa la molécula PD-1 (y para que la molécula etiquetada no unida se elimine hasta el nivel de fondo); (c) determinar el nivel de fondo; y (d) detectar la molécula etiquetada en el sujeto, tal que la detección de la molécula etiquetada por encima del nivel de fondo indique que el sujeto padece una enfermedad o trastorno particular asociado con la expresión o expresión aberrante de PD-1. El nivel de fondo se puede determinar por varios métodos, incluyendo la comparación de la cantidad de molécula etiquetada detectada con un valor estándar determinado previamente para un sistema particular.

25 30 Los anticuerpos anti-PD-1 proporcionados en la presente se pueden usar para ensayar los niveles de proteína en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, ver Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Las etiquetas adecuadas para ensayos con anticuerpos son conocidas en la técnica e incluyen etiquetas enzimáticas, tales como, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), carbono (<sup>14</sup>C), azufre (<sup>35</sup>S), tritio (<sup>3</sup>H), indio (<sup>115m</sup>In, <sup>113m</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), y tecnecio (<sup>99</sup>Tc, <sup>99m</sup>Tc), talio (<sup>201</sup>Ti), galio (<sup>68</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga), paladio (<sup>103</sup>Pd), molibdeno (<sup>99</sup>Mo), xenón (<sup>133</sup>Xe), flúor (<sup>18</sup>F), <sup>153</sup>Sm, <sup>177</sup>Lu, <sup>159</sup>Gd, <sup>149</sup>Pm, <sup>140</sup>La, <sup>175</sup>Yb, <sup>166</sup>Ho, <sup>90</sup>Y, <sup>47</sup>Sc, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>142</sup>Pr, <sup>105</sup>Rh, <sup>97</sup>Ru; luminol; y etiquetas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

35 Las técnicas conocidas en la técnica se pueden aplicar a los anticuerpos etiquetados proporcionados en la presente. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a, el uso de agentes conjugantes bifuncionales (ver, por ejemplo, las patentes de EE.UU. No. 5,756,065; 5,714,631; 5,696,239; 5,652,361; 5,505,931; 5,489,425; 5,435,990; 5,428,139; 5,342,604; 5,274,119; 4,994,560; y 5,808,003).

40 45 50 Alternativa o adicionalmente, se pueden medir los niveles de un ácido nucleico o ARNm codificador del polipéptido PD-1 en la célula, por ejemplo, mediante hibridación fluorescente *in situ* usando una sonda basada en ácido nucleico correspondiente a un ácido nucleico codificador de PD-1 o el complemento del mismo; (FISH; ver WO98/454 79 publicado en octubre de 1998), transferencia tipo Southern, transferencia tipo Northern, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés). También se puede estudiar la sobreexpresión de PD-1 midiendo el antígeno diseminado en un fluido biológico tal como el suero, por ejemplo, usando ensayos basados en anticuerpos (ver también, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 4,933,294, publicada el 12 de junio de 1990; WO91/05264, publicada el 18 de abril de 1991; la patente de EE.UU. No. 5,401,638, publicada el 28 de marzo de 1995; y Sias *et al.*, *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)). Aparte de los ensayos anteriores, el profesional especializado dispone de varios ensayos *in vivo* y *ex vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer células del cuerpo del mamífero a un anticuerpo opcionalmente etiquetado con una etiqueta detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células, por ejemplo, por un escaneo externo de radiactividad o analizando una muestra (por ejemplo, una biopsia u otra muestra biológica) tomada de un mamífero previamente expuesto al anticuerpo.

#### 55 Artículos de fabricación y kits

60 65 También se describe en la presente un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento del cáncer, tal como melanoma, NSCLC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo, TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma no Hodgkin de células B mediastínico primario (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma microcítico de pulmón), cáncer de esófago, carcinoma nasofaringeo (NPC), cáncer de vías biliares, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de tiroides y cáncer salival. El artículo de fabricación puede comprender un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a él. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar hechos de materiales tales como vidrio o plástico. Por lo general, el recipiente contiene una composición que es efectiva para tratar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) proporcionado en la presente. La

etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la condición particular. La etiqueta o prospecto incluirá además instrucciones para administrar la composición de anticuerpos al paciente. También se contemplan artículos de fabricación y kits que comprenden las terapias combinatorias descritas en la presente.

- 5 El prospecto se refiere a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de tales productos terapéuticos. En una realización, el prospecto indica que la composición se usa para tratar el cáncer (tal como el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón o el cáncer colorrectal).
- 10 Además, el artículo de fabricación puede comprender un segundo recipiente que contiene un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus siglas en inglés), solución amortiguadora de sales de fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, como otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.
- 15 También se describen kits útiles para varios fines, por ejemplo, para el aislamiento o la detección de PD-1 en pacientes, opcionalmente en combinación con los artículos de fabricación. Para el aislamiento y purificación de PD-1, el kit puede contener un anticuerpo anti-PD-1 (o fragmento del mismo) proporcionado en la presente acoplado a microesferas (por ejemplo, microesferas Sepharose™). Los kits pueden contener los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) para la detección y cuantificación de PD-1 *in vitro*, por ejemplo, en un ensayo de ELISA o una inmunotransferencia tipo Western.
- 20 Al igual que el artículo de fabricación, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado a él. Por ejemplo, el recipiente contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-PD-1 proporcionado en la presente. Se pueden incluir adicionalmente recipientes que contengan, por ejemplo, diluyentes y amortiguadores, anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso *in vitro* o de diagnóstico previsto.

## 25 Ejemplos

### Ejemplo 1

- 30 Desarrollo de anticuerpos anti-PD-1

El desarrollo de anticuerpos anti-PD-1 se resume a continuación. Se identificaron clones positivos de anticuerpos anti-PD-1 por la examinación de una biblioteca de fagos Fab generada a partir de hibridomas construidos a partir de ratones inmunizados con PD-1 (antígeno PD-1\_ECD recombinante purificado y etiquetado con 6xHis). Para caracterizar los clones se realizaron ensayos funcionales *in vitro*, que se describen con más detalle a continuación.

Brevemente, se incubaron diluciones seriadas de clones de hibridoma con placas recubiertas de proteína PD-1-His por una hora a temperatura ambiente, y se monitorizó la actividad de unión a PD-1 a 450 nm. Las placas se bloquearon con leche al 5 % en solución amortiguadora de sales de fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) por 1 hora a temperatura ambiente, y se lavaron con PBS-tween 20 (PBST, por sus siglas en inglés) antes de añadir las diluciones de hibridoma. Tras la incubación con clones de hibridoma, las placas se lavaron con PBST, se incubaron con IgG-HRP anti-ratón 1:4000 (por sus siglas en inglés) a temperatura ambiente por 1 hora, se lavaron con PBST, se revelaron con tetrametilbencidina (TMB, por sus siglas en inglés) y, por último, se usó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para detener la reacción y se midió la absorbancia a 450 nm.

45 La citometría de flujo mostró que los clones con No. de ID 11, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 27 y 28 se podían unir a PD-1. Las condiciones de citometría de flujo para la valoración de la unión a PD-1 incluyen los pasos de: 1) Las células CHO-S expresadas con PD-1 4E+05 se lavaron con PBS (2 % de FBS, por sus siglas en inglés) dos veces; 2) se añadió sobrenadante de hibridoma, se incubó a 4 °C por 30 min; 3) se centrifugaron las células por 5 min a 500×g; 4) se lavaron con PBS (2 % de FBS) dos veces; 5) se añadió IgG-FITC de cabra diluido 1:150 IgG-FITC antihumana de cabra diluida (por sus siglas en inglés), y se incubó por 30 min a 4 °C; 6) se lavaron las células con PBS (2 % de FBS) dos veces; y 7) las células se suspendieron en 50 µL de PBS 1x, se analizó por citometría de flujo.

55 Se usó citometría de flujo para valorar la capacidad de los sobrenadantes de hibridoma para bloquear la unión entre PD-L1 y PD-1. Los resultados revelaron que el clon No. 11 bloqueaba una unión equivalente a la del anticuerpo anti-PD-1 de referencia, por ejemplo, Nivolumab. El ensayo de unión por citometría de flujo realizado incluye los pasos de: 1) las 4E+05 células por muestra se lavaron con PBS (2 % de FBS) dos veces; 2) se mezclaron 8 µg/mL de biotina-PD-L1 y sobrenadante de hibridoma, la relación de volumen fue de 1:1; 3) se añadieron 60 µL de la mezcla del paso de extracción 2 a las células y se incubaron por 30 min a 4 °C; 4) se lavaron las células dos veces con PBS (2 % de FBS); 5) se incubaron las células con avidina-FITC (dilución 1:65) por 30 min a 4 °C; y 6) se lavaron las células dos veces con PBS (2 % de FBS).

60 Se identificó una colonia PD-1 positiva (c1G4) en células competentes SS320. A continuación se proporcionan las características y secuencias del clon c1G4.

### 65 Ejemplo 2

## Generación del anticuerpo anti-PD-1 1G4 humanizado (h1G4)

- 5 El anticuerpo anti-PD-1 1G4 (h1G4) humanizado se generó usando la región variable de la cadena ligera de la línea germinal humana IGKV1-39\*01 y la región variable de la cadena pesada de la línea germinal humana IGHV3-11\*04 (por sus siglas en inglés, respectivamente). Brevemente, la humanización se llevó a cabo al injertar los residuos de las CDR de la cadena ligera y la cadena pesada del c1G4 quimérico en una estructura similar de cadena ligera y cadena pesada de inmunoglobulina humana. Se pueden generar bibliotecas del anticuerpo humanizado injertado con CDR para su posterior maduración de afinidad *in vitro* basada en el despliegue en fagos para potenciar la afinidad con su antígeno
- 10 10 El alineamiento de secuencias para c1G4 y h1G4 se muestra en las Figuras 8A y 8B. La Figura 8A muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras del c1G4 quimérico, el h1G4 humanizado, la región variable de la cadena ligera de la línea germinal humana IGKV1-39\*01 y el Nivolumab (NIV). La Figura 8B muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas del c1G4 quimérico, el h1G4 humanizado, la región variable de la cadena pesada de la línea germinal humana IGHV3-11\*04 y el Nivolumab (NIV). Las CDR (regiones determinantes complementarias) injertadas a partir de c1G4 para la humanización se marcaron en negritas y subrayado.
- 15 15

**Ejemplo 3**

## Determinación de la constante de disociación de equilibrio (KD) de c1G4 y h1G4

- 20 La afinidad de unión y la cinética se midieron usando resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés). El Fc de IgG antihumano se inmovilizó posteriormente en un chip sensor y después capturó el anticuerpo anti-PD-1 de referencia, c1G4, y h1G4 con un  $R_{\max} \sim 150$  UR. Los experimentos se llevaron a cabo a 25º C, y las mediciones se realizaron con diluciones seriadas de PD-1-His de 58,8 nM a 7,35 nM pasando sobre los anticuerpos capturados en 25 amortiguador HBS-P<sup>+</sup> suplementado con 0,1 % (p/v) de BSA (por sus siglas en inglés, respectivamente). Todos los datos se analizaron con el software de evaluación y las curvas se ajustaron con un modelo de unión de Langmuir 1:1.

- 30 Las cinéticas de asociación y disociación, junto con la afinidad calculada (KD, por sus siglas en inglés), se midieron por resonancia de plasmón superficial (SPR). La mejora de la afinidad por c1G4 y h1G4 en contraste con el anti-PD-1 de referencia también se mostró en la siguiente Tabla 4. Los datos son representativos de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 4

Promedio (n = 2)	ka [1/(M·s)]	kd [1/s]	KD [M]	Mejora
anti-PD-1 de referencia	5,86E+05	7,43E-04	1,77E-09	1,00
c1G4	2,44E+05	1,04E-04	4,34E-10	4,07
h1G4	3,10E+05	7,98E-05	2,65E-10	6,66

**Ejemplo 4**

## Características de unión de los anticuerpos quiméricos c1G4 y humanizados h1G4

*Unión de c1G4 a la proteína recombinante PD-1*

- 40 Se realizaron ensayos de ELISA para valorar la unión del c1G4 quimérico y el anticuerpo anti-PD-1 de referencia a PD-1. Se capturaron diluciones seriadas del c1G4 quimérico y del anti-PD-1 de referencia con PD-1-His en pozos de una placa de microtitulación. La cantidad de anticuerpo capturado en cada pozo se cuantificó usando un anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con HRP-Fc. Se añadió a los pozos el anticuerpo secundario conjugado con HRP y, tras una incubación, se lavó el exceso de anticuerpo secundario. Se añadió TMB a los pozos y, tras la incubación, se detuvo la reacción y se midió la actividad de la HRP controlando el aumento de la absorbancia a 450 nm. Los resultados de las pruebas de ELISA realizadas para comparar la unión de los anticuerpos anti-PD-1 c1G4 quiméricos y el anticuerpo anti-PD-1 de referencia a PD-1-His se muestran en la Figura 1A.
- 45 45

- 50 La Figura 1B muestra los resultados de un segundo conjunto de los ELISA realizados para comparar la unión de los anticuerpos anti-PD-1 c1G4 quiméricos y el anticuerpo anti-PD-1 de referencia a PD-1-AP. Se capturaron diluciones seriadas del c1G4 quimérico y del anticuerpo anti-PD-1 de referencia con anticuerpo Fc de IgG antihumano en pozos de una placa de microtitulación. Se cuantificó la cantidad de anticuerpo capturado en cada pozo usando PD-1 conjugado con AP. Tras la incubación, se lavó el exceso de PD-1-AP. Se añadió sustrato de fosfatasa alcalina a los pozos y, tras la incubación, se detuvo la reacción y se midió la actividad AP al control el aumento de la absorbancia a 405 nm.
- 55 55

Los resultados indican que el c1G4 quimérico y el anticuerpo anti-PD-1 de referencia son capaces de unirse tanto a PD-1-His como a PD-1-AP.

*Bloqueo y competencia de la unión al ligando PD-1 de c1G4*

Las diluciones seriadas del c1G4 quimérico y del anticuerpo anti-PD-1 de referencia se incubaron con PD-L1-AP a RT

(temperatura ambiente, por sus siglas en inglés) por 2 horas. Cada mezcla de anticuerpo: antígeno se añadió a pozos recubiertos de PD-1-His de una placa de microtitulación. Tras una incubación y lavado, se añadió pNPP (por sus siglas en inglés) a los pozos y se incubó por 1 hora para la detección de PD-L1-AP unido. La actividad AP se midió al controlar el aumento de la absorbancia a 405 nm. La Figura 2A muestra los resultados de los ELISA realizados para comparar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 c1G4 químéricos y el anticuerpo anti-PD-1 de referencia para bloquear la unión de PD-L1 y PD-1. Se observó que tanto el c1G4 químérico como el anticuerpo anti-PD-1 de referencia bloquean la unión de PD-L1 a PD-1.

La Figura 2B muestra los resultados de los ELISA realizados para determinar la capacidad del anticuerpo c1G4 anti-PD-1 químérico para competir con el anticuerpo anti-PD-1 de referencia en la unión a PD-1-His. Las diluciones seriadas del c1G4 químérico y del anticuerpo anti-PD-1 de referencia se premezclaron con una concentración fija de PD-1-His (0,1 µg/mL) a temperatura ambiente por 2 horas y posteriormente se unieron a una concentración fija de la placa recubierta con el anticuerpo anti-PD-1 de referencia (4 µg/mL). La cantidad de PD-1-His unido en cada pozo se cuantificó usando un anticuerpo secundario anti-His conjugado con HRP. Tras la incubación, se lavó el exceso de anticuerpo secundario. Se añadió TMB a los pozos y, tras la incubación, se detuvo la reacción y se midió la actividad de la HRP controlando el aumento de la absorbancia a 450 nm. Se añadió una concentración fija de PD-1-His (0,1 µg/mL) a la placa recubierta con una concentración fija de NIV (4 µg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora, y posteriormente se añadieron a los pozos diluciones seriadas del c1G4 químérico y del anticuerpo anti-PD-1 de referencia. Tras una incubación y lavado, se cuantificó la cantidad de PD-1-His unido en cada pozo usando un anticuerpo secundario anti-His conjugado con HRP.

Estos datos indican que tanto el c1G4 químérico como el anticuerpo anti-PD-1 de referencia son capaces de bloquear la unión de PD-L1 a PD-1, y el c1G4 químérico es capaz de competir con el anti-PD-1 de referencia por la unión a PD-1-His.

#### *Unión de c1G4 y h1G4 a células CHO-S que expresan PD-1*

Se desarrollaron líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) que expresan PD-1 humano recombinante en la superficie celular y se usaron para determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales PD-1 humanos por citometría de flujo. Se transfecaron células CHO con plásmidos de expresión con ADNc de longitud completa que codifica formas transmembranales de PD-1. La valoración de la unión de los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 c1G4 y h1G4 se realizó incubando las células transfecadas con los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 diluidos en serie en amortiguador de FACS (PBS con 1 % de FBS). Las células se lavaron con amortiguador de flujo y la unión se detectó con un anticuerpo Fc de IgG de conejo etiquetado con biotina y estreptavidina-PE. Los análisis de citometría de flujo se usaron con el Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc.).

Las Figuras 3A y 3B proporcionan la unión del anticuerpo c1G4 a células CHO-S (Figura 3A) y a células CHO-S transfecadas con PD-1 (Figura 3B) por citometría de flujo. Los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 de referencia se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. Los resultados indican que el c1G4 se unió a las células CHO transfecadas con PD-1 pero no a las células CHO no transfecadas con PD-1 humano.

Las características de unión del anticuerpo humanizado h1G4 y el original c1G4 a PD-1 en la superficie celular se muestran en la Figura 9.

#### *Bloqueo de la unión del ligando a PD-1 por anticuerpos c1G4 y h1G4 seleccionados*

Se usó un ensayo de citometría de flujo para probar la capacidad de los anti-PD-1 c1G4 y h1G4 de bloquear la unión del ligando PD-L1 a las células CHO-S que expresan PD-1. Se probó la capacidad de los anti-PD-1 c1G4 y h1G4 de bloquear la unión del ligando PD-L1 a las células CHO-S que expresan PD-1 usando un ensayo de citometría de flujo. Los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. Las células CHO-S que expresan PD-1 se suspendieron en amortiguador de FACS (PBS con 1 % de FBS). Se añadieron varias concentraciones de los anticuerpos anti-PD-1 c1G4 y h1G4, los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 de referencia a la suspensión celular y se incubaron a 4 °C por 30 minutos. Se lavó el anticuerpo no unido y se añadió la proteína de fusión PD-L1-con Fc etiquetada con biotina y se incubó a 4 °C por 30 minutos. Las células se lavaron y posteriormente se tiñeron con estreptavidina-PE a 4 °C por 30 minutos. Los análisis de citometría de flujo se usaron con el Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc.).

El anticuerpo monoclonal anti-PD-1 c1G4 bloqueó la unión de PD-L1 a las células CHO-S transfecadas con PD-1, medida por la intensidad media de fluorescencia (MFI<sub>1</sub>) de la tinción. Estos datos demuestran que tanto c1G4 como h1G4 bloquearon la unión de PD-L1 a las células CHO-S transfecadas con PD-1, medida por la intensidad media de fluorescencia (MFI<sub>2</sub>) de la tinción (Figuras 4 y 10).

#### *Unión del anticuerpo anti-PD-1 humanizado a células T humanas activadas*

Las células T humanas se aislaron de PBMC usando el kit MagniSort™ Human T Cell Enrichment (eBioscience). Se activaron células T aisladas con 5 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés) por 3 días para estimular la expresión de PD-1. Se recolectaron las células T activadas y se incubaron en amortiguador de FACS (PBS con 2 % de FBS) con bloqueador Fc humano (eBioscience) por 20 minutos a 4 °C.

La unión del anticuerpo monoclonal anti-PD-1 se valoró al incubar las células T activadas con los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 diluidos en serie en amortiguador de FACS. Las células se lavaron con amortiguador de flujo y la unión se detectó con un anticuerpo Fc de IgG $\gamma$  de conejo etiquetado con FITC. Los análisis de citometría de flujo se usaron con el Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc.). El anticuerpo anti-PD-1 de referencia y Avastin (anti-VEGF) se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente.

Los resultados de la unión del anticuerpo anti-PD-1 h1G4 humanizado a células T humanas activadas se muestran en la Figura 12.

#### 10 Ejemplo 5

##### Efecto de anti-PD-1 c1G4 y h1G4 en la producción de citocinas en una reacción leucocitaria mixta (MLR)

Se empleó una reacción leucocitaria mixta para demostrar el efecto del bloqueo de la ruta PD-1 en las células efectoras 15 linfocitarias. En el ensayo se probó la proliferación de células T, la secreción de IFN- $\gamma$  y la secreción de IL-2 en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-PD-1.

Las células T humanas se purificaron a partir de PBMC usando el Lympho-kwik T (One Lambda, Inc.). Las células T aisladas 20 se suspendieron en PBS y se etiquetaron con 1  $\mu$ M de CFSE (por sus siglas en inglés) a temperatura ambiente por 10 minutos. Tras lavar las células con el medio completo (RPMI-1640 con un 10 % de FBS), las células T etiquetadas con CFSE se suspendieron en el medio completo a una concentración de 1E6/células.

Las células dendríticas alogénicas se generaron a partir de PBMC. Las PBMC aisladas se incubaron con 200 U/mL de IL-3 humana recombinante (eBioscience) durante la noche para permitir que la población de monocitos/macrófagos se 25 adhiriera a las placas. Se retiraron las células no adherentes y se lavaron las placas dos veces con el medio completo. Las células de las placas se cultivaron posteriormente en un medio completo con 200 U/mL de IL-4 humana (eBioscience) y 200U/mL de GM-CSF humano (por sus siglas en inglés, eBioscience) por 6 días. Las células dendríticas (DC, por sus 30 siglas en inglés) derivadas de monocitos se maduraron añadiendo TNF-alfa (100 U/mL) al cultivo el día 6 y se incubaron durante la noche. Las DC maduras se tripsinizaron, recolectaron y suspendieron en el medio completo a una concentración de 1E5/células.

Cada reacción contenía 10<sup>5</sup> células T etiquetadas con CFSE y 10<sup>4</sup> células dendríticas alogénicas en un volumen total de 200  $\mu$ L. Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 c1G4 o h1G4 se añadieron a cada cultivo a diferentes concentraciones 35 de anticuerpos. No se usó ningún anticuerpo o se usó un anticuerpo anti-VEGF (Avastin) como control negativo. Se usó un anticuerpo anti-PD-1 de referencia como control positivo. Las células se cultivaron por 5 días a 37 °C. Después del día 5, se tomaron 100  $\mu$ L de medio de cada cultivo para medir las citocinas. Los niveles de citocinas se midieron usando los kits ELISA MAX™ Deluxe de IFN- $\gamma$  o IL-2 humanos (BioLegend). Se recolectaron las células y se analizó la proliferación de células T por citometría de flujo.

40 La Figura 5A ilustra la secreción de IL-2 dependiente de la concentración promovida por el anticuerpo monoclonal c1G4 contra PD-1 humano, y la Figura 5B ilustra la secreción de IFN- $\gamma$  dependiente de la concentración promovida por el anticuerpo monoclonal c1G4 contra PD-1 humano.

La Figura 13A ilustra la secreción de IL-2 dependiente de la concentración promovida por el anticuerpo monoclonal h1G4 45 contra PD-1 humano, y la Figura 13B ilustra la secreción de IFN- $\gamma$  dependiente de la concentración promovida por el anticuerpo monoclonal h1G4 contra PD-1 humano.

El anticuerpo monoclonal c1G4 contra PD-1 humano promueve la proliferación de células T CD4 $^{+}$  y CD8 $^{+}$  en un ensayo 50 de reacción leucocitaria mixta. La Figura 6A ilustra la proliferación de células T CD4 $^{+}$  a distintas concentraciones de anticuerpos c1G4, y la Figura 6B ilustra la proliferación de células T CD8 $^{+}$  a distintas concentraciones de anticuerpos c1G4. La Figura 14A ilustra la proliferación de células T CD4 $^{+}$  a distintas concentraciones de anticuerpos h1G4, y la Figura 14B ilustra la proliferación de células T CD8 $^{+}$  a distintas concentraciones de anticuerpos h1G4.

En resumen, estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 c1G4 y h1G4 promueven la 55 proliferación de células T, la secreción de IFN- $\gamma$  y la secreción de IL-2. En cambio, los cultivos con el anticuerpo de control negativo no mostraron un aumento de la proliferación de células T ni de la secreción de IFN- $\gamma$  o IL-2.

#### Ejemplo 6

##### 60 Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de los anticuerpos c1G4 y h1G4

Se investigó la actividad *in vivo* de los anticuerpos PD-1 antihumanos en modelos de xenoinjerto de ratón usando ratones inmunocomprometidos NOD/SCID (diabéticos no obesos/inmunodeficiencia combinada grave, por sus siglas en inglés, respectivamente). Las células cancerosas y las PBMC humanas aisladas se mezclaron inmediatamente antes de la 65 administración subcutánea en la proporción efector/objetivo (E:T) indicada. Cada ratón fue inoculado bilateralmente con las mezclas de células cancerosas y PBMC humanas. Se asignaron cuatro ratones a cada grupo experimental. La primera

dosis del artículo de prueba se administró por vía intraperitoneal 1 día después del injerto de células cancerosas/efectoras. Los ratones recibieron dosis del artículo de prueba dos veces por semana por 3-4 semanas. La formación del tumor se observó en cada animal dos veces por semana. Los tumores se midieron con un calibrador y los volúmenes tumorales (V) se calcularon usando la siguiente fórmula:

5

$$V [\text{mm}^3] = 0,5 \times (\text{longitud} [\text{mm}] \times \text{ancho} [\text{mm}] \times \text{ancho} [\text{mm}] / 2)$$

Las curvas de crecimiento tumoral con anticuerpos c1G4 o h1G4 en el modelo de xenoinjerto HT29/PBMC se muestran en las Figuras 7A y 15A, respectivamente. El volumen tumoral individual en el día 28 con c1G4 o en el día 21 con h1G4 en el modelo de xenoinjerto HT29/PBMC se presentó en las Figuras 7B y 15B, respectivamente. Asimismo, en la Figura 16A se muestran las curvas de crecimiento tumoral con el anticuerpo h1G4 en NCI-H292/PBMC. El volumen tumoral individual en el día 25 con el anticuerpo h1G4 se presentó en la Figura 16B. Todos los datos son las medias  $\pm$  SEM.

Asimismo, se estudió la terapia combinada de anti-PD-1 y anticuerpo monoclonal anti-VEGF en el modelo de xenoinjerto HT29/PBMC. Los datos que indican una inhibición tumoral potenciada con la combinación de anti-PD-1 y anti-VEGF se presentan en la Figura 21.

### Ejemplo 7

20 Reactividad cruzada de especies de h1G4

Las proteínas de fusión PD-1 recombinantes humana, de rata, de ratón y de mono Cynomolgus se adquirieron a Sino Biological Inc. PD-1/Fc (9 ng por pozo) se inmovilizaron en placas de ensayo de 96 pozos incubándolas por la noche a 4 °C. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon usando leche desnatada al 5 % en PBS por una hora a temperatura ambiente. Tras lavar las placas tres veces con PBST, se incubaron las concentraciones indicadas de h1G4, el anti-PD-1 de referencia (control positivo) y HLX01 (control negativo) con las proteínas inmovilizadas por una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBST y posteriormente se incubaron por una hora a temperatura ambiente con IgG antihumana F(ab)'2 de cabra etiquetada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluida 1/10.000 en PBS. Tras el lavado, las placas se revelaron usando TMB (eBioscience). La absorbancia se leyó a la longitud de onda de 450 nm por un lector de microplacas Vmax (Molecular Devices).

Las Figuras 11A-11D muestran la reactividad cruzada de especies de h1G4 a humano (Figura 11A), mono Cynomolgus (Figura 11B), ratón (Figura 11C), y rata (Figura 11D).

### Ejemplo 8

Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del anticuerpo h1G4

*Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del anticuerpo h1G4 en ratones hPD1 KI*

40

Se investigó la actividad *in vivo* de los anticuerpos anti-PD-1 humanos en ratones C57BL/6 reactivados con PD-1 humanos (ratones hPD1 KI). Los ratones se inocularon por vía subcutánea con células humanas de cáncer de colon de ratón transfectadas con PD-L1 (1E6 células por ratón). Los tratamientos con anticuerpos se iniciaron cuando los volúmenes tumorales alcanzaron aproximadamente 75 mm<sup>3</sup> (Día 9). Se asignaron cuatro animales a cada grupo experimental antes del tratamiento. Los animales recibieron dosis de anticuerpos anti-PD-1 dos veces por semana por 3-4 semanas. La formación del tumor se observó en cada animal dos veces por semana. Los tumores se midieron con un calibrador y los volúmenes tumorales (V) se calcularon usando la siguiente fórmula:

50

$$V [\text{mm}^3] = 0,5 \times (\text{longitud} [\text{mm}] \times \text{ancho} [\text{mm}] \times \text{ancho} [\text{mm}] / 2)$$

En la Figura 17 se muestra la actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del anticuerpo h1G4 en ratones hPD1 KI.

*Estudio de eficacia de h1G4 en un modelo de xenoinjerto de línea celular de cáncer de mama triple negativo (TNBC) en ratones NSG humanizados*

55

Se inocularon por vía subcutánea ratones NSG humanizados (NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/SzJ) con MDA-MB-231 (línea celular humana de cáncer de mama triple negativo). Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en 3 grupos (n = 9/grupo) basados en el volumen tumoral de acuerdo con la tabla cuando los volúmenes tumorales alcanzan ~ 60-150 mm<sup>3</sup>. Los ratones recibieron dosis intraperitoneales de h1G4 una vez cada 7 días en los días 0, 7, 14, 21 y 28 del estudio. Keytruda (anti-PD-1) se inyectó por vía intraperitoneal una vez cada 5 días en los días 0, 5, 10, 15 y 20 del estudio. La formación del tumor se observó en cada animal cada 3-4 días. Los tumores se midieron con un calibrador y los volúmenes tumorales (V) se calcularon usando la siguiente fórmula:

65

$$V [\text{mm}^3] = 0,5 \times (\text{longitud} [\text{mm}] \times \text{ancho} [\text{mm}] \times \text{ancho} [\text{mm}] / 2)$$

La Figura 18 ilustra el estudio de eficacia de h1G4 en un modelo de xenoinjerto de línea celular de cáncer de mama triple

negativo (TNBC) en ratones NSG humanizados.

#### Ejemplo 9

- 5 Determinación de la constante de disociación de equilibrio (KD) de los anticuerpos anti-PD-1 madurados por afinidad 33B, 66E y 711D

La Tabla 5 muestra una secuencia de aminoácidos de las CDR de 33B, 66E y 711D examinadas a partir de la maduración por afinidad basada en el despliegue en fagos en comparación con h1G4.

10

Tabla 5

CDR	L1	L2	L3
h1G4	KASQDVTTAVA (SEQ ID NO: 9)	WASTRHT (SEQ ID NO: 10)	QQHYTIPWT (SEQ ID NO: 11)
33B	KAST <u>D</u> VTTAVA (SEQ ID NO: 15)	WAS <u>L</u> RHT (SEQ ID NO: 16)	QQHY <u>G</u> IPWT (SEQ ID NO: 17)
66E	KAK <u>Q</u> DVTTAVA (SEQ ID NO: 21)	WASTRHT (SEQ ID NO: 10)	QQHY <u>W</u> IPWT (SEQ ID NO: 22)
711D	KASQDV <u>T</u> AVA (SEQ ID NO: 24)	WASTRHT (SEQ ID NO: 10)	QQHYTIPWT (SEQ ID NO: 11)
	H1	H2	H3
h1G4	FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12)	TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13)	VSYYYGIDF (SEQ ID NO: 14)
33B	FR <u>FS</u> NYGMS (SEQ ID NO: 18)	TISGGGSN <u>A</u> Y (SEQ ID NO: 19)	<u>T</u> ISYYYGIDF (SEQ ID NO: 20)
66E	FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12)	TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13)	VSYYYGID <u>L</u> (SEQ ID NO: 23)
711D	FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12)	TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13)	<u>S</u> YYYGIDL (SEQ ID NO: 25)

La Tabla 6 muestra las cinéticas de asociación y disociación, junto con la afinidad calculada (KD) de 33B, 66E y 711D medida por resonancia de plasmón superficial (SPR). La mejora de la afinidad de los anticuerpos anti-PD-1 en contraste con el anticuerpo anti-PD-1 de referencia también se mostró en la Tabla 6. Los datos son representativos de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 6

Promedio (n = 2)	ka [1/(M·s)]	kd [1/s]	KD [M]	Mejora
anti-PD-1 ref	4,91E+05	1,49E-03	3,05E-09	1,00
h1G4	4,57E+05	2,16E-04	4,79E-10	6,37
c1G4	5,50E+05	1,77E-04	3,25E-10	9,38
33B	2,90E+05	8,44E-04	2,91E-09	1,05
66E	4,74E+05	4,66E-04	9,79E-10	3,12
711D	7,72E+05	2,50E-04	5,34E-10	5,71

20 Ejemplo 10

Funciones de los anticuerpos madurados por afinidad

25 *Efecto de los anticuerpos anti-PD-1 humanos (33B, 66E y 711D) sobre la producción de citocinas en una reacción leucocitaria mixta (MLR)*

Siguiendo el mismo método descrito anteriormente, este estudio muestra que los anticuerpos monoclonales humanos contra PD-1 humano, tales como 66E y 711D, promueven la secreción de IFN-γ y la secreción de IL-2 en un ensayo de reacción leucocitaria mixta. El anticuerpo anti-PD-1 de referencia y Avastin (anti-VEGF) se usaron como control positivo y control negativo, respectivamente. La Figura 19A ilustra la secreción de IL-2 dependiente de la concentración por los anticuerpos madurados por afinidad, y la Figura 19B ilustra la secreción de IFN-γ dependiente de la concentración por los anticuerpos madurados por afinidad.

30 *Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral de anticuerpos anti-PD-1 humanos en el modelo de xenoinjerto HT29/PBMC*

35 Siguiendo el mismo método descrito anteriormente, los ratones (n = 4/grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de la línea celular de cáncer de colon humano HT29 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Se inyectaron anticuerpos anti-PD-1 por vía intraperitoneal en ratones dos veces por semana a partir del día 1. El volumen tumoral se midió dos veces por semana. La actividad de inhibición del crecimiento tumoral de los anticuerpos

anti-PD-1 humanos madurados por afinidad en el modelo de xenoinjerto HT29/PBMC se muestra en la Figura 20. Todos los datos son las medias  $\pm$  SEM.

**Ejemplo 11**

5

Terapias combinadas PD-1

Se investigó la actividad *in vivo* de la terapia combinada con anti-PD-1 y otros anticuerpos terapéuticos en modelos de xenoinjerto de ratón usando ratones inmunocomprometidos NOD/SCID (diabéticos no obesos/inmunodeficiencia combinada grave). Las células cancerosas y las PBMC humanas aisladas se mezclaron inmediatamente antes de la administración subcutánea en la proporción efector/objetivo (E:T) indicada. Cada ratón fue inoculado bilateralmente con las mezclas de células cancerosas y PBMC humanas. Se asignaron cuatro o cinco animales a cada grupo experimental. La primera dosis del artículo de prueba se administró por vía intraperitoneal 1 día después del injerto de células cancerosas/efectoras. Los animales recibieron dosis del artículo de prueba dos veces por semana por 3-4 semanas. La formación del tumor se observó en cada animal dos veces por semana. Los tumores se midieron con un calibrador y los volúmenes de los tumores (V) se calcularon usando la siguiente fórmula:

$$V [\text{mm}^3] = 0,5 \times (\text{longitud} [\text{mm}] \times \text{ancho} [\text{mm}] \times \text{ancho} [\text{mm}] / 2)$$

20 *Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del mAb anti-PD-1 más el mAb anti-VEGF en el modelo de xenoinjerto de NSCLC en ratones*

En estos estudios, los ratones ( $n = 4$ /grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de células humanas de NSCLC NCI-H292 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Los anticuerpos anti-PD-1 (h1G4) y anti-VEGF (HLX04) se inyectaron por vía intraperitoneal en los ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 22A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 22B. Todos los datos son las medias  $\pm$  SEM. Estos datos ilustran que el mAb anti-PD-1, h1G4, en combinación con el mAb anti-VEGF, HLX04, suprime el crecimiento tumoral de xenoinjertos de NCI-H292 con mayor eficacia que cualquiera de los dos agentes usados por separado.

30

En otros estudios, los ratones ( $n = 4$ /grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de células humanas de NSCLC NCI-H292 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Los anticuerpos anti-PD-1 (h1G4), y anti-VEGFR2 (HLX06) se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 23A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 23B. Todos los datos son las medias  $\pm$  SEM. Estos datos ilustran que el mAb anti-PD-1, h1G4, en combinación con el mAb anti-VEGFR2, HLX06, suprime el crecimiento tumoral de xenoinjertos de NCI-H292 con mayor eficacia que cualquiera de los dos agentes usados por separado.

35

*Actividad inhibitoria del crecimiento tumoral del mAb anti-PD-1 más el mAb anti-EGFR en el modelo de xenoinjerto de NSCLC en ratones*

Siguiendo el mismo método descrito anteriormente, los ratones ( $n = 4$ /grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de células humanas NSCLC NCI-H292 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Los anticuerpos anti-PD-1 (HLX10) y anti-EGFR (HLX07) se inyectaron por vía intraperitoneal en los ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 24A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 24B. Todos los datos son las medias  $\pm$  SEM. Estos datos indican que el mAb anti-PD-1, HLX10 (h1G4), en combinación con el mAb anti-EGFR, HLX07, suprime el crecimiento tumoral de xenoinjertos de NCI-H292 con mayor eficacia que cualquiera de los dos agentes usados por separado.

50

Además, los ratones ( $n = 5$ /grupo) se injertaron por vía subcutánea con la mezcla de células cancerosas de colon humano HT-29 y PBMC humanas recién aisladas (células cancerosas:PBMC = 3:1). Los anticuerpos anti-PD-1 (HLX10) y anti-EGFR (HLX07) se inyectaron por vía intraperitoneal en los ratones dos veces por semana a partir del día 1. Las curvas de crecimiento tumoral se muestran en la Figura 25A. El volumen tumoral individual en el día 21 se presentó en la Figura 25B. Todos los datos son las medias  $\pm$  SEM.

55

Estos datos indican que el mAb anti-PD-1, HLX10 (h1G4), en combinación con el mAb anti-EGFR, HLX07, suprime el crecimiento tumoral de xenoinjertos HT-29 mutantes en BRAF con mayor eficacia que HLX10 usado solo. El tratamiento con HLX10 más HLX07 produce una inhibición ligeramente mayor del crecimiento tumoral que el tratamiento con HLX07 solo. La tasa media de inhibición del crecimiento tumoral del tratamiento con HLX10 más HLX07 y con HLX07 solamente fue de 47 % y 28 %, respectivamente.

Los Ejemplos anteriores se ofrecen únicamente con fines ilustrativos.

65 Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 (secuencia de nucleótidos de c1G4\_LC):

CAGCTCGAGGATATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCAATGTCACATCAGTAGGA  
 GACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGACTACTGCTGTAGCCTG  
 GTATCAACAAAAACCAGGGCAATCTCTAAACTACTGATTTACTGGGCATCCACCCG  
 GCACACTGGAGTCCCTGATCGCTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCT  
 CACCATCAACAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCACTTTATTACTGTCAAGCAACATTA  
 CACTATTCCGTGGACGTTGGTGGAGGCCAACAGCTGAAATCAAACGTACTGTGG  
 CTGCACCATCTGCTTCATCTTCCCACATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGC  
 CTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA  
 GGTGGATAACGCCCTCCAATGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAACAGAGCAGGACA  
 GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC  
 GAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGCCGTGAGCTCGCCCGT  
 CACAAAGAGCTCAACAGGGAGAGTGT

SEQ ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos de c1G4\_LC, subrayado: CDR definidas por Kabat, ver la Figura 8A):  
QLEDIVMTQSHKFMSTSVDGRVSI**KASODV**TTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWA**STR**  
HTGVPDRTGSGSGTDYTL TINSVQAEDLALYYCOOH**Y**TI**P**WTFGGGT**K**LEIKRTVAA  
 PSVFI~~PPPS~~DEQLKSGTASVVCLLNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS  
 TYSLSSTLTL~~SKADYE~~HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEQ ID NO: 3 (secuencia de nucleótidos de c1G4\_HC):

GAAGTGATTTGGTGGAGTCGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAA  
 ACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTAACTATGGCATGTCTGGGTTCGC  
 CAGACTCCGGAGAAGAGCCTGGAGTGGCTGCAACCATTAGTGGTGGTAGTAA  
 CATCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGCGATTCAACCATCTCCAGAGACAATGCCA  
 AGAACAAACCTGTTCTGCAAATGAGCGGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCCTGTATT  
 ACTGTGTATGTATTACTATGGAATAGACTCTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG  
 TCTCCTCGGCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTAGCACCCCTGCTCCAGGA  
 GCACCTCCGAGACACAGCCGCGCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA  
 CCGGTGACGGTGTGTTGAAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC  
 GGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC  
 CAGCAGCTGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAACA  
 CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCA  
 GCACCTGAGTTCTGGGGGACCATCAGTCTCTGTTCCCCAAAACCCAAGGAC  
 ACTCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACCTGCGTGGTGGACGTGAGCCAG  
 GAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACCTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGC  
 CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC  
 TCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCC  
 AACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAGGGCAGCC  
 CCGAGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCTCATCCCAGAGGAGATGACCAAGAAC  
 AGGTCAAGCCTGACCTGCGTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGCGACATGCCGTGGAGT  
 GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCCTCCCGTGTGGAC  
 TCCGACGGCTCTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG  
 GAGGGGAATGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAACTACACA  
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTGGTAAA

SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos de c1G4\_HC, subrayado: CDR definidas por Kabat, ver la Figura 8B):  
**EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTESNYGMSWVRQTPKLEWVATISGGGSNI**  
 YYPDSVKGRFTISRDNAKNNFLQMSLRSEDTALYYCVSYYGIDFWGQGTSVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKGPPCPAFLGGPSV  
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSOEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPREEQFNST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEM  
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW  
 QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 5 (secuencia de nucleótidos de h1G4\_LC):

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTC  
 ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGACTACTGCTGTAQCCCTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATTGGCATCCACCCGGCACACTGG  
 GGTCCCCTCAAGGTCAGTGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTACCATCAG  
 CAGTCTGCAACCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAAGAACATTACACTATTCC  
 GTGGACGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAACGTAAGTGTGGCTGCACCAT  
 CTGCTTCACTTCCCCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTGT  
 GTGCGCTGCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATA  
 ACGCCCTCCAATCGGTAACTCCCAGGAGACTGTACAGAGGAGGACAGCAAGGAC  
 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA  
 CAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTGCCGTACAAAGA  
 GCTTCAACAGGGAGAGTGT

5

SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos de h1G4\_LC, subrayado: CDR definidas por Kabat, ver la Figura 8A):  
**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVTTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWAISTRHTGV**  
 PSRFSGSGSGTDFITLTISSLOQEDFATYYC**QOQHYTIPWTFGGT**KLEIKRTVAAPSVFIFP  
 PSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST  
 LTLSKADYERHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEQ ID NO: 7 (secuencia de nucleótidos de h1G4\_HC):

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAG  
 ACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCACTAATGGCATGTCTGGATCCGC  
 CAGGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGTTCAACCATTAGTGGTGGTAGTAA  
 CATCTACTACGCAGACTCTGTAAGGGCCGATTCAACCATTCCAGGGACAACGCCA  
 AGAACTCACTGTATCTGAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTAT  
 TACTGTGTATCGTATTACTATGGAATAGACTCTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC  
 GTCTCTCGCCCTCACCAAGGGCCATCGGCTTCCCGCTAGCACCCCTGCTCCAGG  
 AGCACCTCCAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGA  
 ACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAAGGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCC  
 CGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAOCGTGGTACCCGTGCCCT  
 CCAGCAGCTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATACAAGCCAGCAAC  
 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCAAATATGGTCCCCATGCCACCATGCC  
 AGCACCTGAGTCTGGGGGACCATCAGTCTCTGTTCCCCCAAACCCAAAGGA  
 CACTCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTCACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGAGCCA  
 GGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGAGCCA  
 CCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC  
 CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGTGAACGCCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTC  
 CAACAAAGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGC  
 CCCAGAGGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCAGGGAGGAGATGACCAAGAAC  
 CAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTACCCCAAGCAGCATGCCGTGGAG  
 TGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGA  
 CTCCGACGGCTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA  
 GGAGGGAAATGTCTCTCATGCTCCGTGATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACAC  
 ACAGAAGAGCCTCTCCGTCTGGTAAA

SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos de h1G4\_HC, subrayado: CDR definidas por Kabat, ver la Figura 8B):  
**QVQLVESGGGLVKP<sup>GG</sup>SLRLSCAASGFTESNYGMSWIRQAPGKGLEWVST**TISGGGSNI**  
YYADSVVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCYSYYYGIDFWGQQTSVTVSS  
 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH<sup>K</sup>PSNTKVDKRVESKYGPPC<sup>PP</sup>CPA<sup>PE</sup>FLGGPSV  
 FLEPPKPKD<sup>TL</sup>MISRTPEVTCVVVDV<sup>S</sup>QEDPEVQFNWYVDGVEVHN<sup>A</sup>KT<sup>K</sup>PREEQFNST  
 YRVVSVLT<sup>V</sup>LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
 TKNQVSLTCLVK<sup>G</sup>FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<sup>P</sup>VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW  
 QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK**

SEQ ID NO: 9 (CDR-L1 de c1G4 y h1G4): KASQDVTTAVA

5

SEQ ID NO: 10 (CDR-L2 de c1G4 y h1G4): WASTRHT

SEQ ID NO: 11 (CDR-L3 de c1G4 y h1G4): QQHYTIPWT

10 SEQ ID NO: 12 (CDR-H1 de c1G4 y h1G4): FTFSNYGMS

SEQ ID NO: 13 (CDR-H2 de c1G4 y h1G4): TISGGGSNIY

15 SEQ ID NO: 14 (CDR-H3 de c1G4 y h1G4): VSYYYGIDF

SEQ ID NO: 15 (CDR-L1 de 33B): KASTDVTTAVA

15

SEQ ID NO: 16 (CDR-L2 de 33B): WASLRHT

20 SEQ ID NO: 17 (CDR-L3 de 33B): QQHYGIPWT

SEQ ID NO: 18 (CDR-H1 de 33B): FRFSNYGMS

25 SEQ ID NO: 19 (CDR-H2 de 33B): TISGGGSNAY

25

SEQ ID NO: 20 (CDR-H3 de 33B): TSYYYGIDF

SEQ ID NO: 21 (CDR-L1 de 66E): KAKQDVTTAVA

30 SEQ ID NO: 22 (CDR-L3 de 66E): QQHYWIPWT

SEQ ID NO: 23 (CDR-H3 de 66E): VSYYYGIDL

35

SEQ ID NO: 24 (CDR-L1 de 711D): KASQDV<sup>T</sup>NAVA

SEQ ID NO: 25 (CDR-H3 de 711D): SSYYYGIDL

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-PD-1 que comprende una secuencia de dominio variable de la cadena ligera (VL) que comprende (1) una CDR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos KASQDVTTAVA (SEQ ID NO: 9); (2) una CDR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WASTRHT (SEQ ID NO: 10); y (3) una CDR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQHYTIPWT (SEQ ID NO: 11), y una secuencia de dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende (1) una CDR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos FTFSNYGMS (SEQ ID NO: 12); (2) una CDR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGGSNIY (SEQ ID NO: 13); y (3) una CDR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos VSYYYGIDF (SEQ ID NO: 14).
- 5
2. El anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde un fragmento de unión a antígeno del anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fab, Fab', un F(ab)<sub>2</sub>, un Fv de cadena única (scFv), un fragmento Fv, un diacuerpo, y un anticuerpo lineal.
- 10
3. El anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo multiespecífico.
4. El anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 está conjugado con un agente terapéutico o una etiqueta.
- 15
5. El anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la etiqueta se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, un tinte fluorescente y una enzima.
- 20
6. El anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo comprende una secuencia Fc de una IgG humana.
- 25
7. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Un vector de expresión que codifica la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7.
- 30
9. Una célula que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 8.
10. Un método para producir un anticuerpo anti-PD-1 que comprende cultivar la célula de acuerdo con la reivindicación 9 y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.
- 35
11. Una composición que comprende el anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. Un método para detectar una proteína PD-1 en una muestra de un paciente poniendo en contacto el anticuerpo anti-PD-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 con la muestra y detectando el anticuerpo anti-PD-1 unido a la proteína PD-1.
- 40
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el anticuerpo anti-PD-1 se usa en un ensayo inmunohistoquímico (IHC) o en un ensayo ELISA.
- 45
14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11 para usar en un método para tratar un cáncer en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad efectiva de la composición de acuerdo con la reivindicación 10 al sujeto, opcionalmente en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, NSCLC, cabeza y cuello, cáncer urotelial, cáncer de mama triple negativo (TNBC), cáncer gástrico, linfoma de Hodgkin clásico (cHL), linfoma mediastínico primario de células B no Hodgkin (NHL PMBCL), mesotelioma, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer esofágico, carcinoma nasofaríngeo (NPC), cáncer del tracto biliar, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de tiroides, y cáncer salival.
- 50
15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde además se administra al sujeto:
- 55
- (a) un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un agente antineoplásico, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento y un agente citotóxico;
- (b) un anticuerpo terapéutico contra VEGF, VEGFR2, o EGFR; o
- 60
- (c) radioterapia.

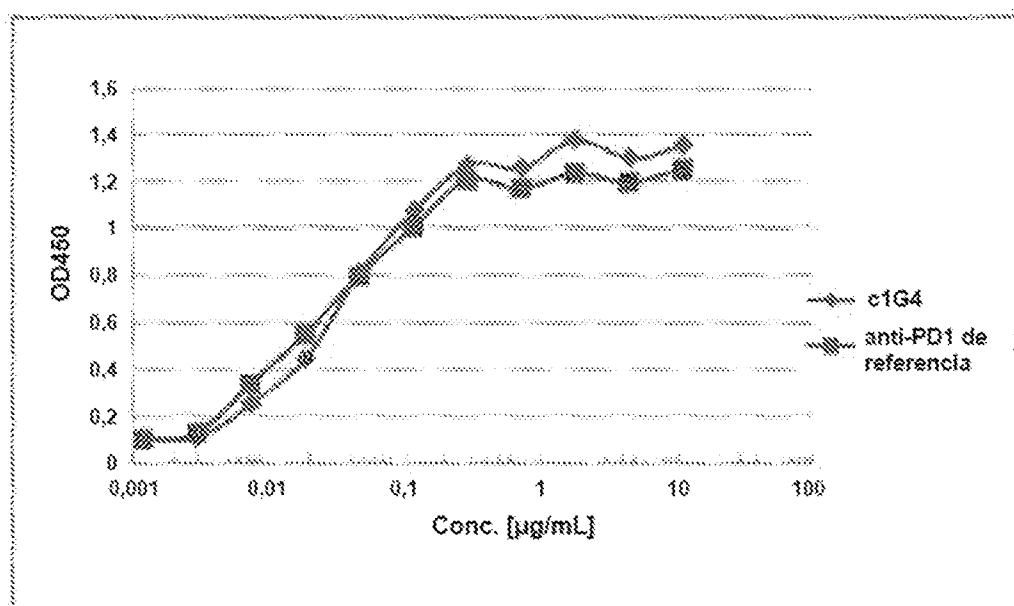


Figura 1A

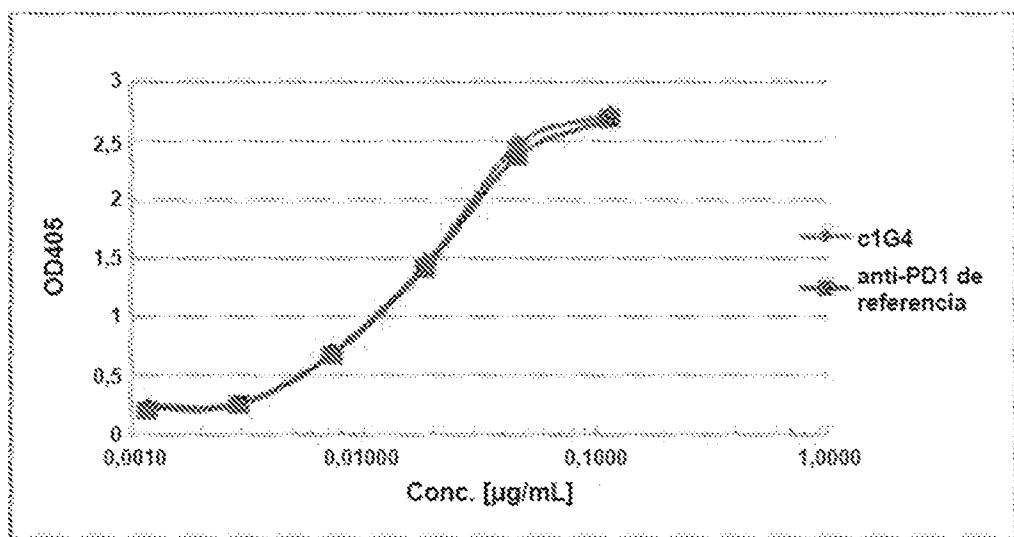


Figura 1B

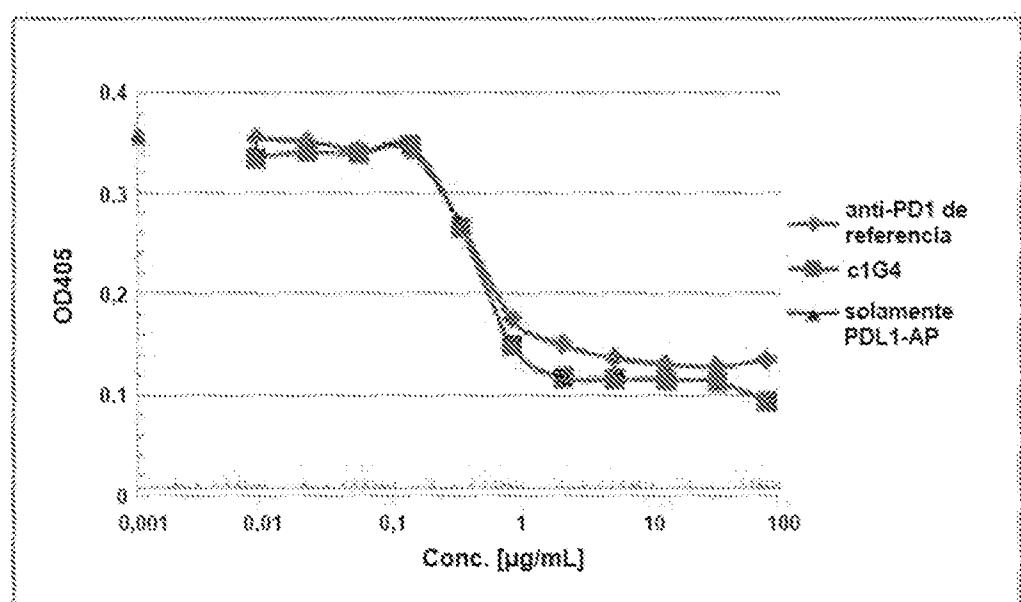


Figura 2A

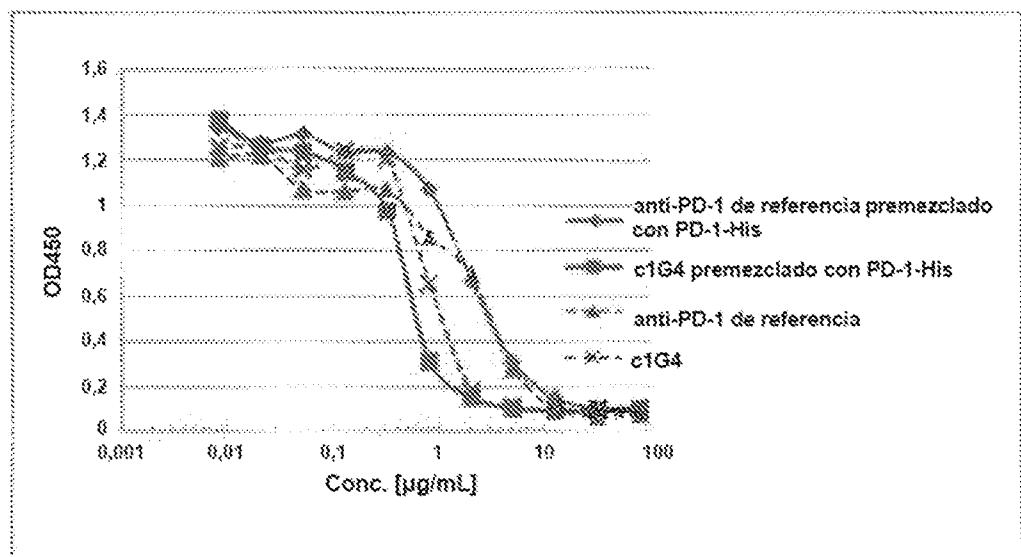


Figura 2B

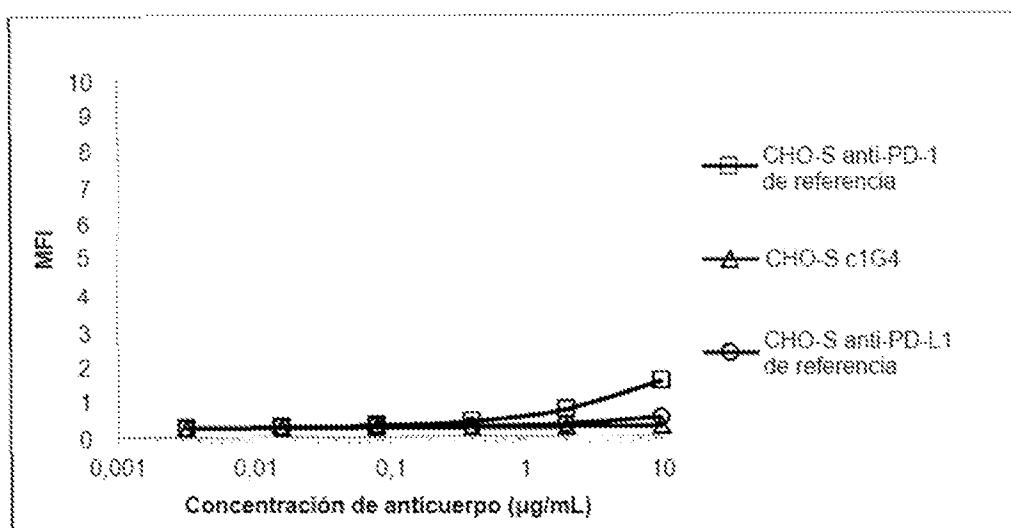


Figura 3A

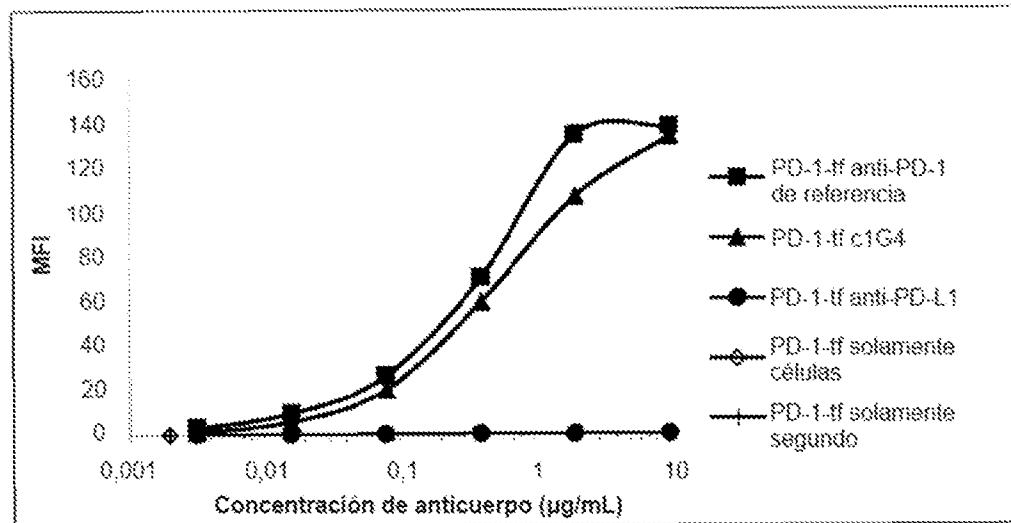


Figura 3B

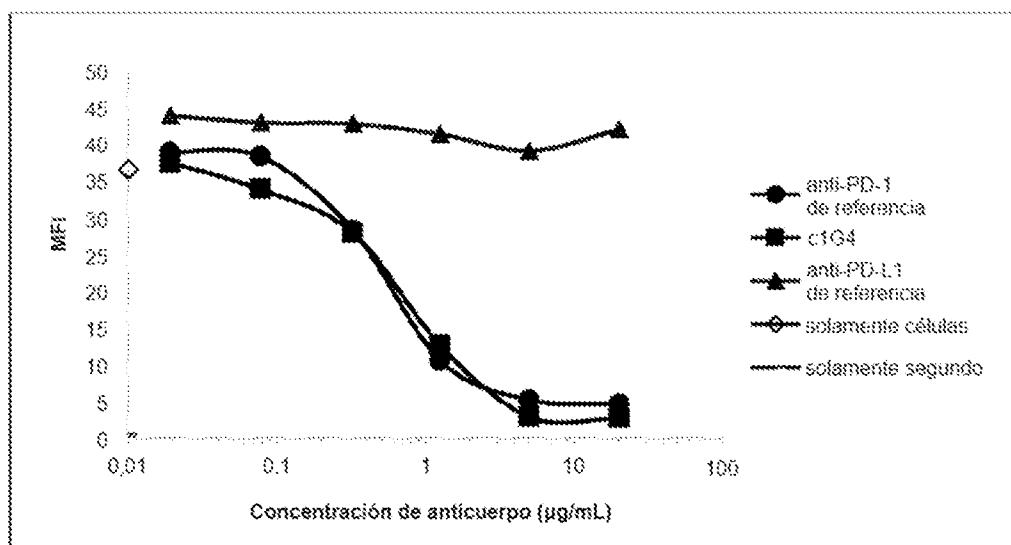


Figura 4

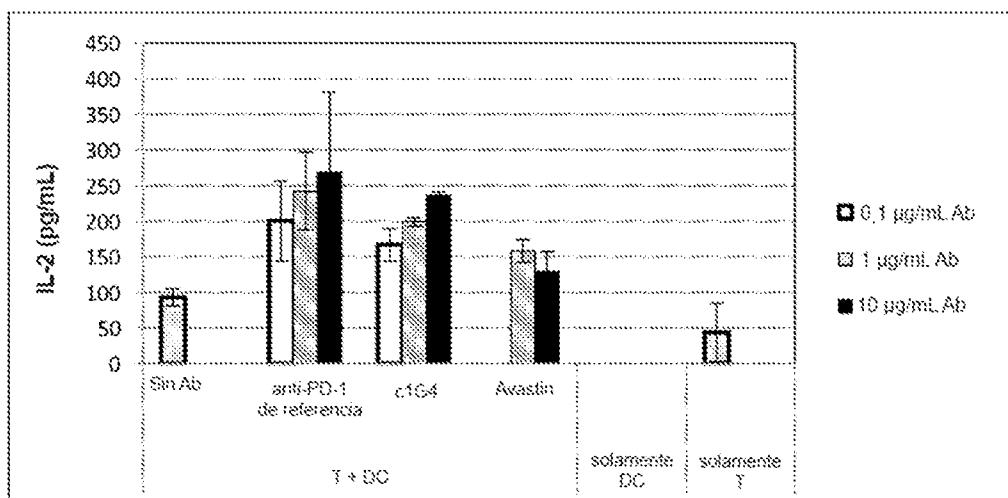


Figura 5A

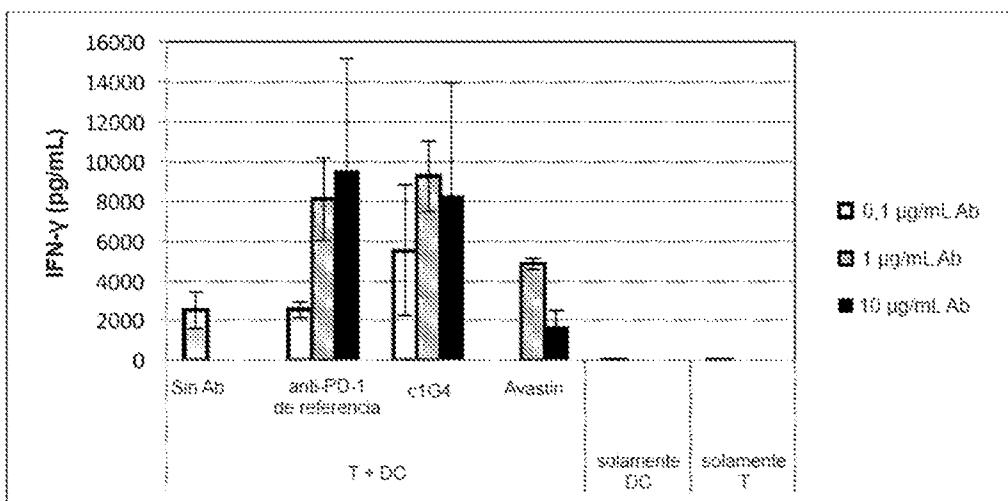


Figura 5B

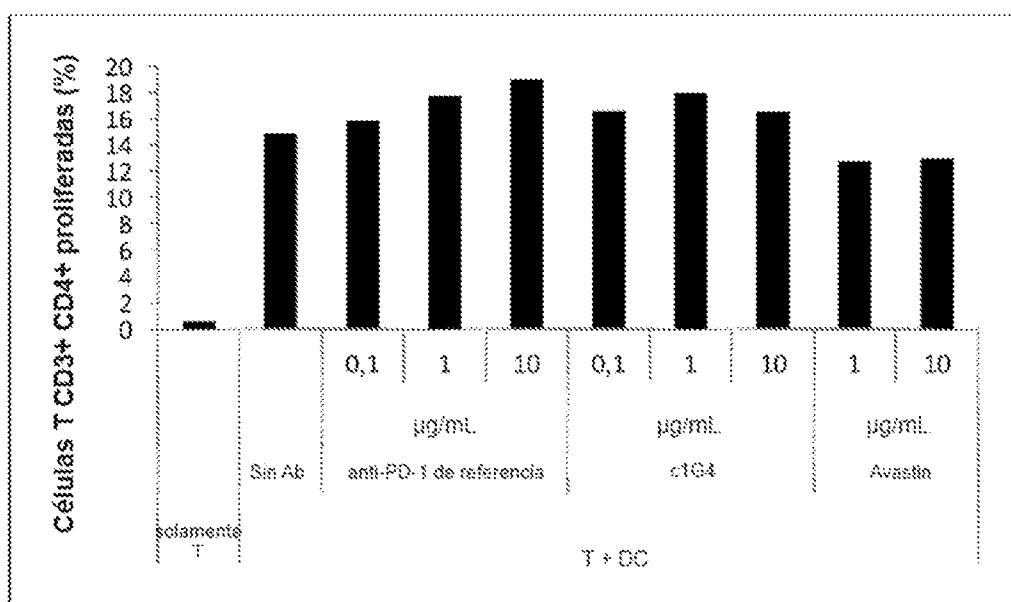


Figura 6A

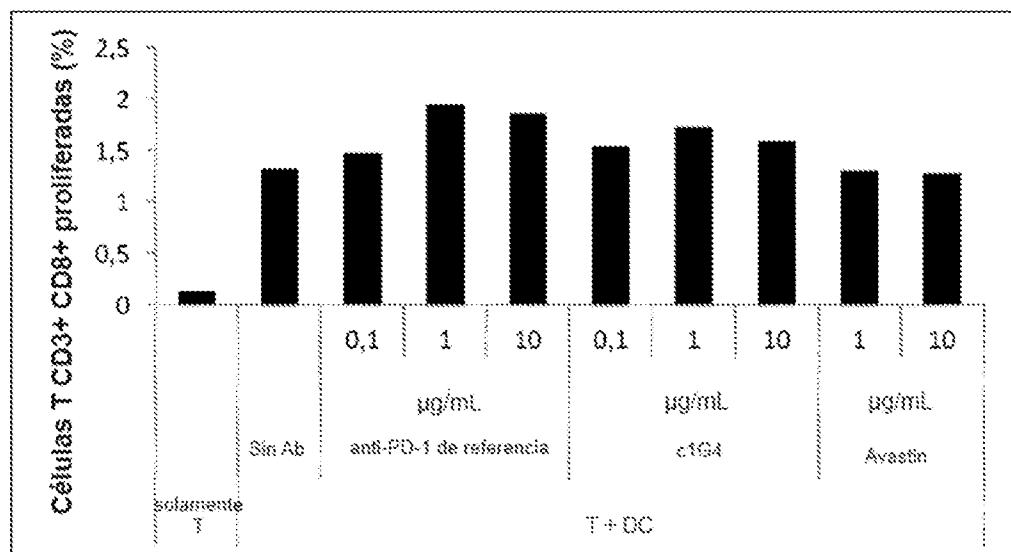
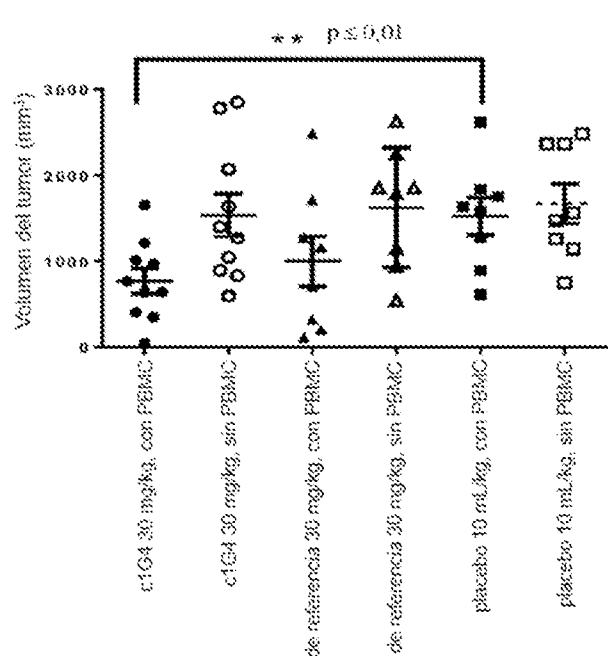
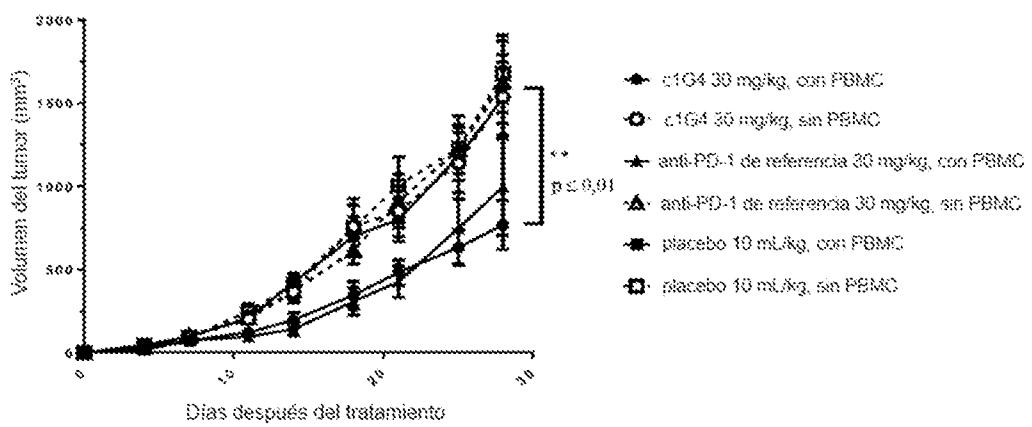


Figura 6B



	1	56			
c1G4_LC	QLEDIVKMTQS	KKFMSTGVGD	RVSITCKASQ	DVTTAVAWYQ	QKPGQSPRKIL
h1G4_LC	...DIQMTQS	PSIISASVGD	RVТИTCKASQ	DVTTAVAWYQ	QKPGKAPRKIL
IGKV1-39-01	...DIQMTQS	PSIISASVGD	RVТИTCKASQ	SISSYLNWYQ	QKPGKAPRKIL
NIV_LC	...EIVLTQS	PAFLSLSPGE	RATLSCRASQ	<u>SVSSYLA</u> WYQ	QKPGQAPRLL
	51				100
c1G4_LC	IIWASTERHTG	VFDKFTGSGS	GTDFTLTINS	VQAEDLALYY	<u>QQQHYTIPWT</u>
h1G4_LC	IIWASTERHTG	VPSRFEGSGS	GTDFTLTINS	LQPEDPATYY	<u>QQQHYTIPWT</u>
IGKV1-39-01	IIWANSLQSG	VPSRFEGSGS	GTDFTLTINS	LQPEDPATYY	<u>QQQSYDF..</u>
NIV_LC	II <u>DASNRATG</u>	IPARFSGSGS	GTDFTLTINS	LEPEDPAVYY	<u>QQQSSNWPRT</u>
	101				150
c1G4_LC	FGGGTTKLEIK	RTVAAPSVFI	FPPSDEQLRS	GTASVVCLLN	NFYFREAKVQ
h1G4_LC	FGGGTTKLEIK	RTVAAPSVFI	FPPSDEQLRS	GTASVVCLLN	NFYFREAKVQ
IGKV1-39-01	.....	.....	.....	.....	.....
NIV_LC	FGGGTTKVEIK	RTVAAPSVFI	FPPSDEQLRS	GTASVVCLLN	NFYFREAKVQ
	151				200
c1G4_LC	WKVDNALQSG	NSQESVTECGQ	SKDSTYSLSS	TITLSKADYE	KHKVYACEVT
h1G4_LC	WKVDNALQSG	NSQESVTECGQ	SKDSTYSLSS	TITLSKADYE	KHKVYACEVT
IGKV1-39-01	.....	.....	.....	.....	.....
NIV_LC	WKVDNALQSG	NSQESVTECGQ	SKDSTYSLSS	TITLSKADYE	KHKVYACEVT
	201	217			
c1G4_LC	HQGLSSSPVTK	SFNRGEC			
h1G4_LC	HQGLSSSPVTK	SFNRGEC			
IGKV1-39-01	.....	.....			
NIV_LC	HQGLSSSPVTK	SFNRGEC			

Figura 8A

c1G4_NC h1G4_NC TGNV3-11-04 NIV_NC	1	EVNLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYGMSWYEQT PGKGLEWVAT EVNLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS NYGMSWYEQA PGKGLEWVST QVQLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS DTYGMSWLEQA PGKGLEWVST QVQLVESGGG VVQPGGSLKL DCKASCITFS <u>NSGMHHWV</u> EQA PGKGLEWVRY
	51	
		100
		ISGGGSNIYY ADSVKGRFTI SPDAEAKNLQ LQMSGLSSED TAVNYC <u>V</u> SYY ISGGGSNIYY ADSVKGRFTI SPDAEAKNLQ LQMSNLRAED TAVNYC <u>V</u> SYY ISGGGSNIYY ADSVKGRFTI SPDAEAKNLQ LQMSNLRAED TAVNYC <u>..</u> IWYDGSSKRYY ADSVKGRFTI SPDAEAKNLQ LQMSNLRAED TAVNYC <u>ATN</u> .
	101	
		150
		YGIDFWGQST SVTVSSASTK GPSVFFLAPC SRSTSESTAA LQCLNKDYFP YGIDFWGQST SVTVSSASTK GPSVFFLAPC SRSTSESTAA LQCLNKDYFP ..... DDYWQGQST LVTVSSSTK. GPSVFFLAPC SRSTSESTAA LQCLNKDYFP
	151	
		200
		EPVTVSSWNSG ALTSGVHTEFP AVLQSSGLYS LGSVVTVFDS SLGPKTYTCN EPVTVSSWNSG ALTSGVHTEFP AVLQSSGLYS LGSVVTVFDS SLGPKTYTCN ..... EPVTVSSWNSG ALTSGVHTEFP AVLQSSGLYS LGSVVTVFDS SLGPKTYTCN
	201	
		250
		VDKPKSNTKV DERVESKYGP PCPPCPAPERF LOGPSPVFLFP PKPKDTLMIS VDKPKSNTKV DERVESKYGP PCPPCPAPERF LOGPSPVFLFP PKPKDTLMIS ..... VDKPKSNTKV DERVESKYGP PCPPCPAPERF LOGPSPVFLFP PKPKDTLMIS
	251	
		300
		RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FHWYVDCVEV HNAKTKPREEQ FNSTTYRVVS RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FHWYVDCVEV HNAKTKPREEQ FNSTTYRVVS ..... RTPEVTCVVV DVSQEDPEVQ FHWYVDCVEV HNAKTKPREEQ FNSTTYRVVS
	301	
		350
		VLTVLHQDWL NGKEYKCKV SNGLPSSIEK TISKANGQPR EPQVYTLPPS VLTVLHQDWL NGKEYKCKV SNGLPSSIEK TISKANGQPR EPQVYTLPPS ..... VLTVLHQDWL NGKEYKCKV SNGLPSSIEK TISKANGQPR EPQVYTLPPS
	351	
		400
		QEENTKHQVS LTCLVKGFYF SDAVENEQN QOPENSYKTT FFVLDSDGSF QEENTKHQVS LTCLVKGFYF SDAVENEQN QOPENSYKTT FFVLDSDGSF ..... QEENTKHQVS LTCLVKGFYF SDAVENEQN QOPENSYKTT FFVLDSDGSF
	401	
		443
		FLYSRNLTVDK SRWQEGNVFC CSVMREALHN NYTQKSLSIS LSK FLYSRNLTVDK SRWQEGNVFC CSVMREALHN NYTQKSLSIS LSK ..... FLYSRNLTVDK SRWQEGNVFC CSVMREALHN NYTQKSLSIS LSK

Figura 8B

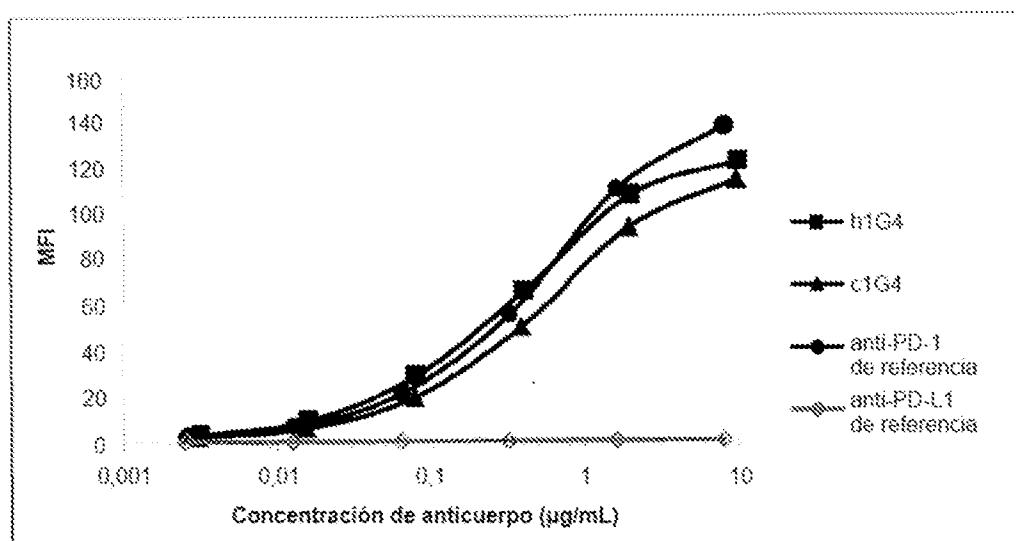


Figura 9

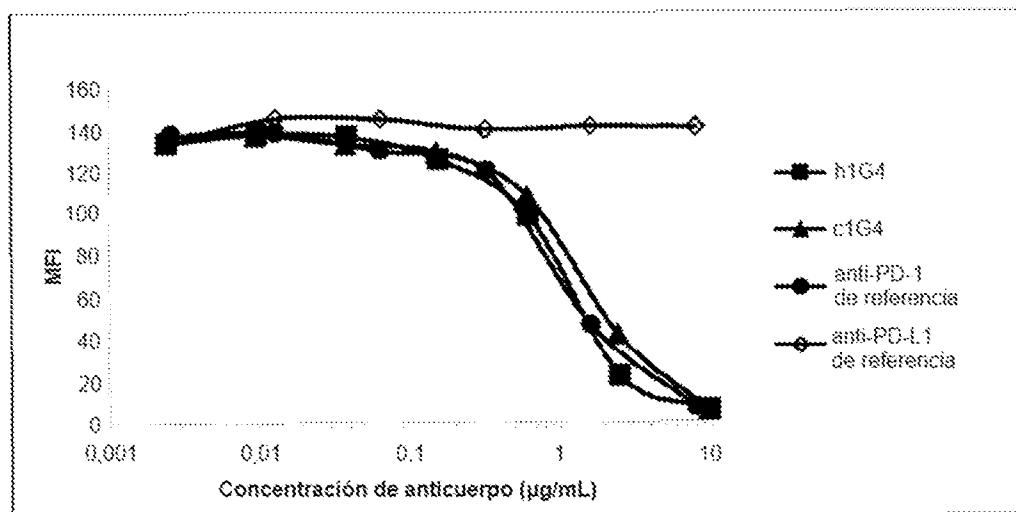


Figura 10

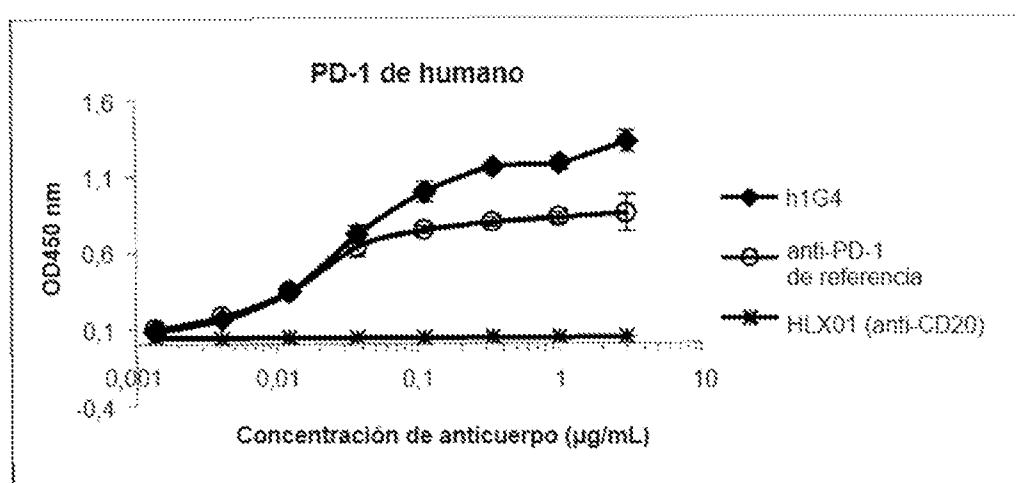


Figura 11A

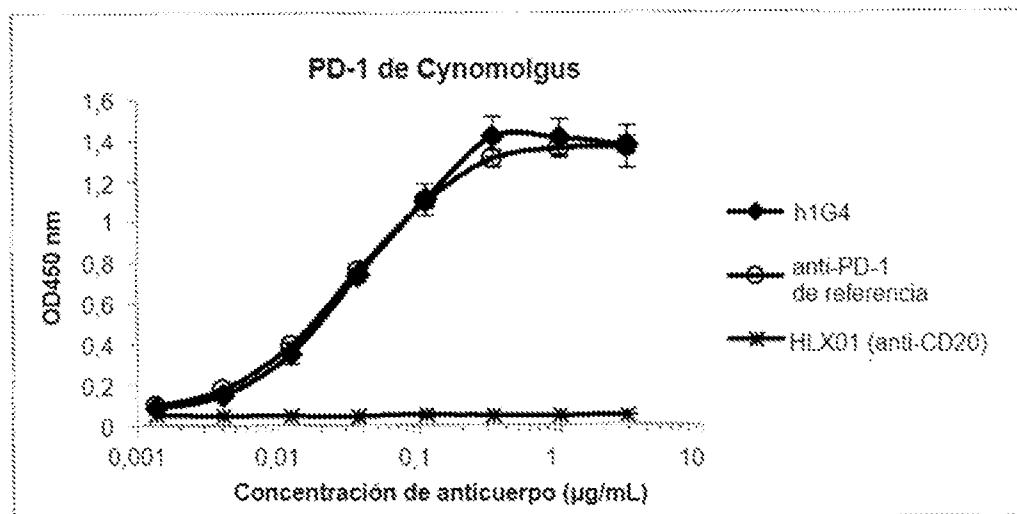


Figura 11B

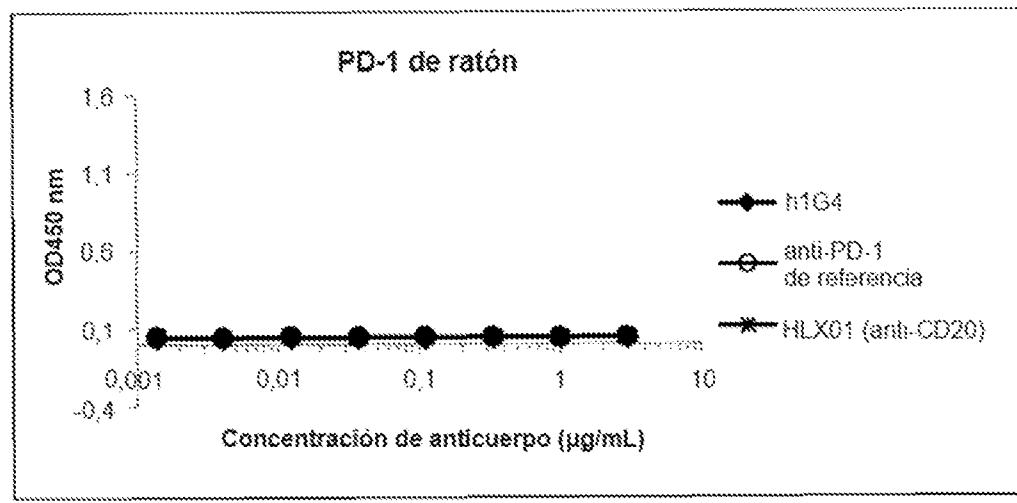


Figura 11C

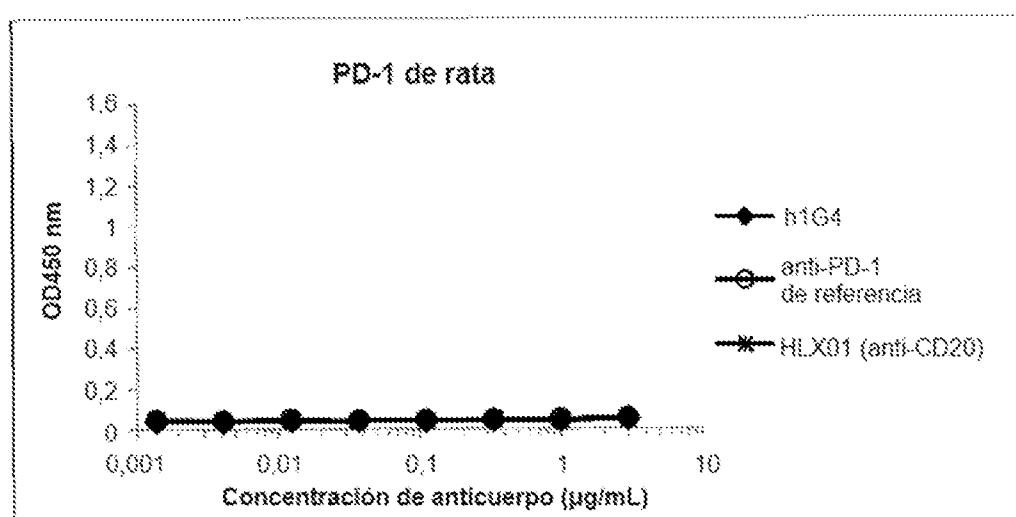


Figura 11D

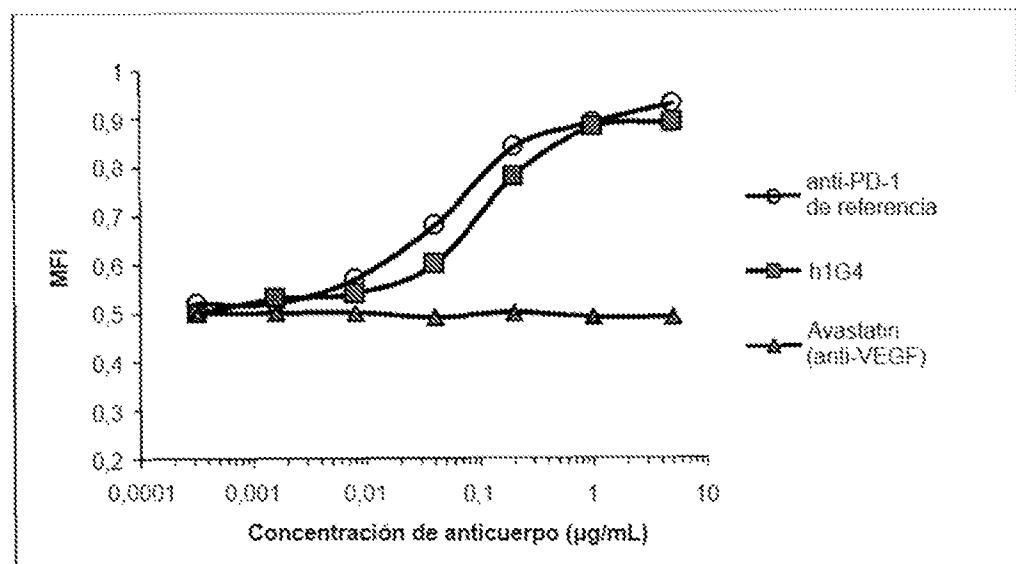


Figura 12

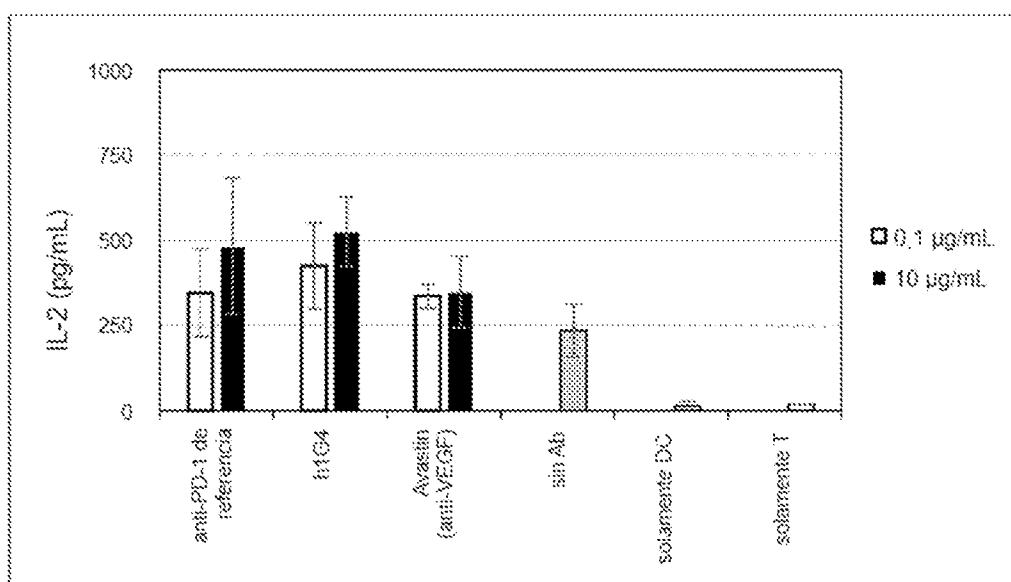


Figura 13A

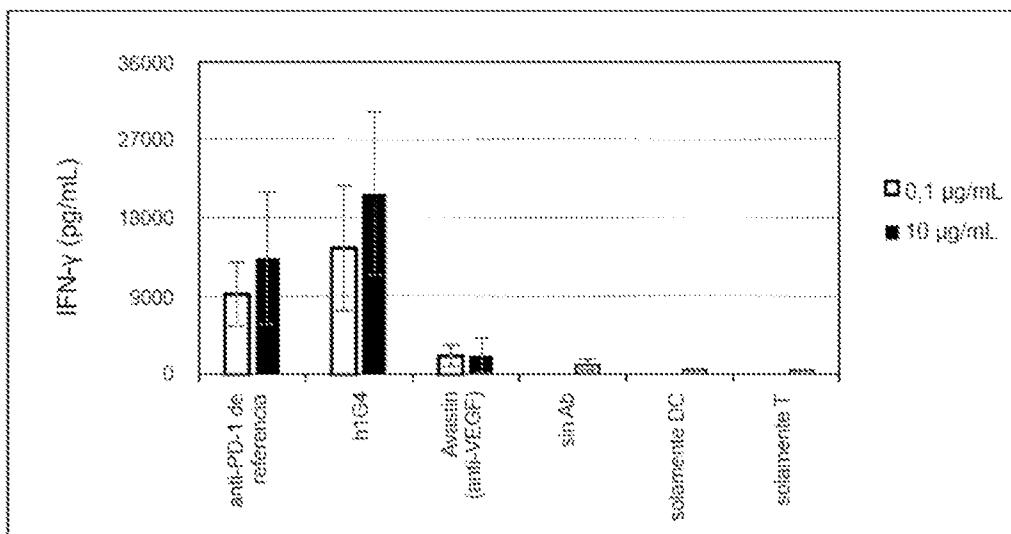


Figura 13B

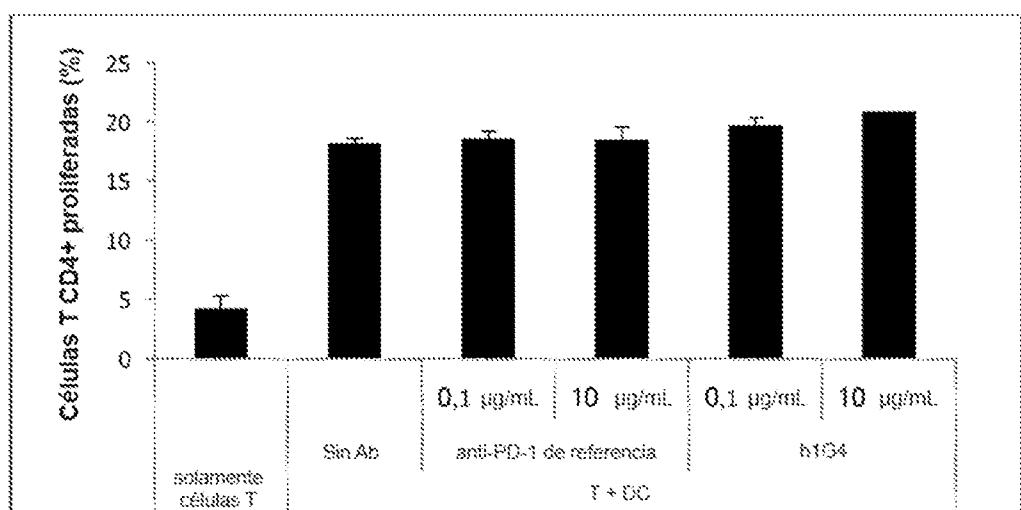


Figura 14A

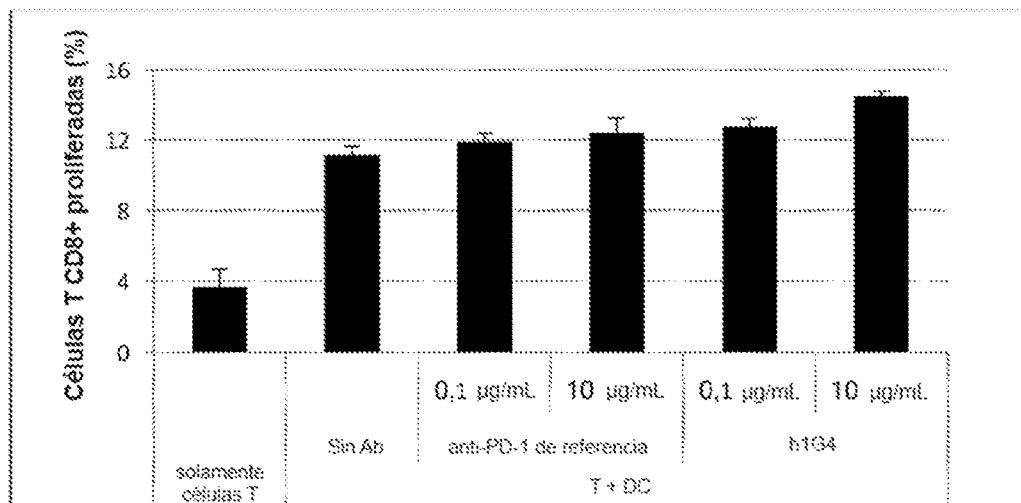
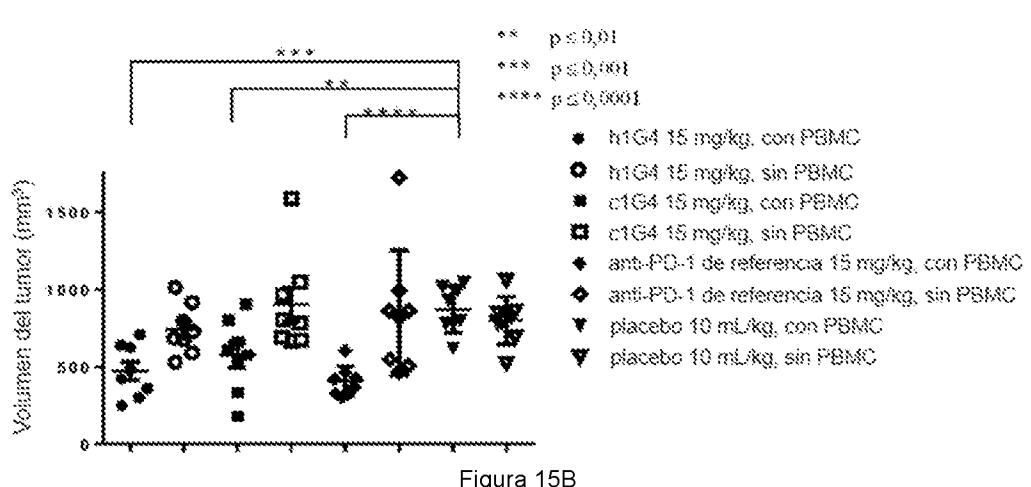
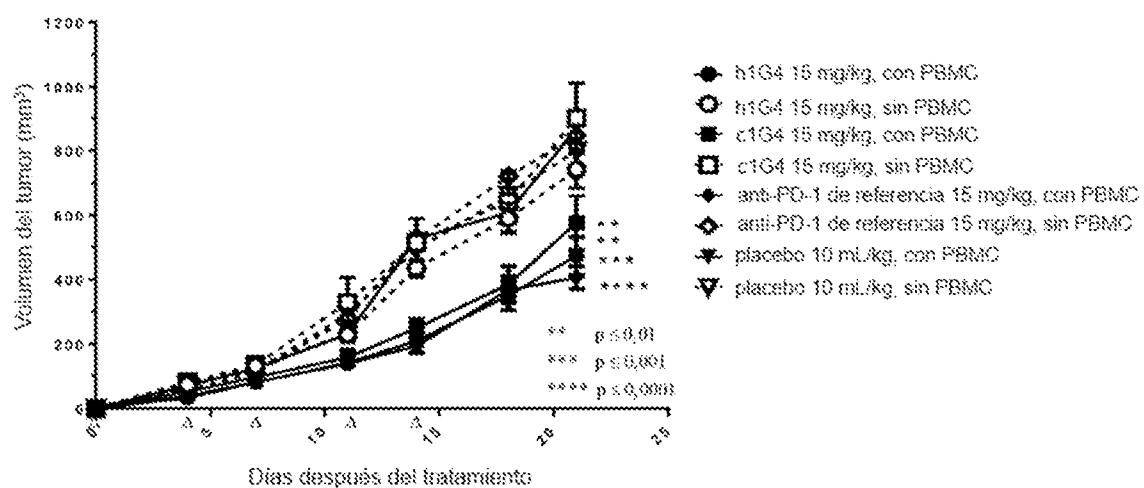
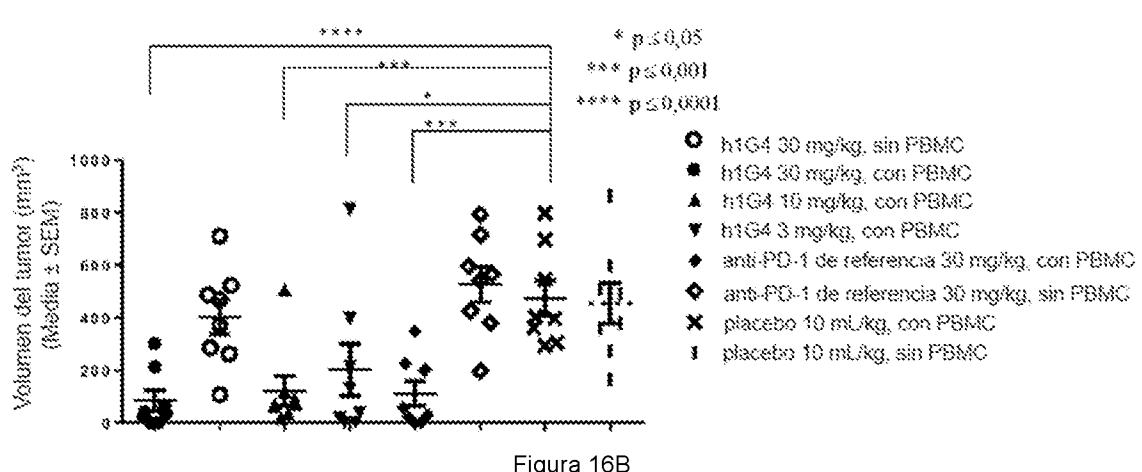
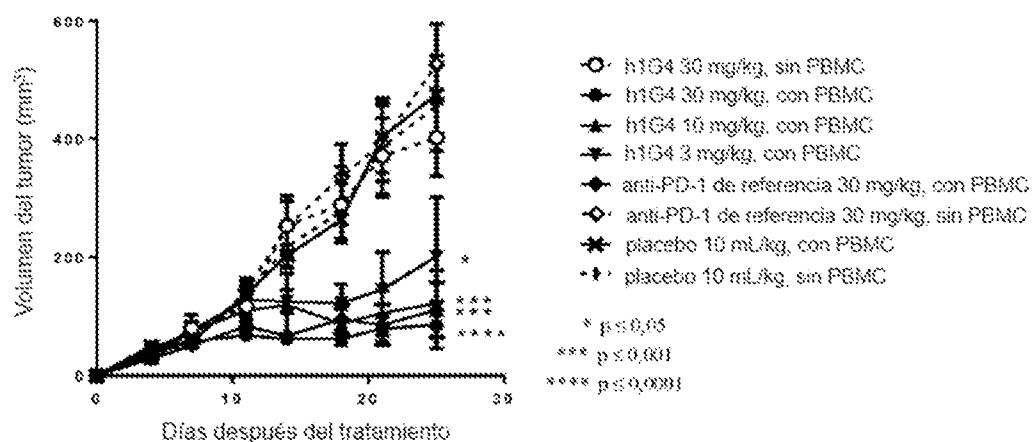


Figura 14B





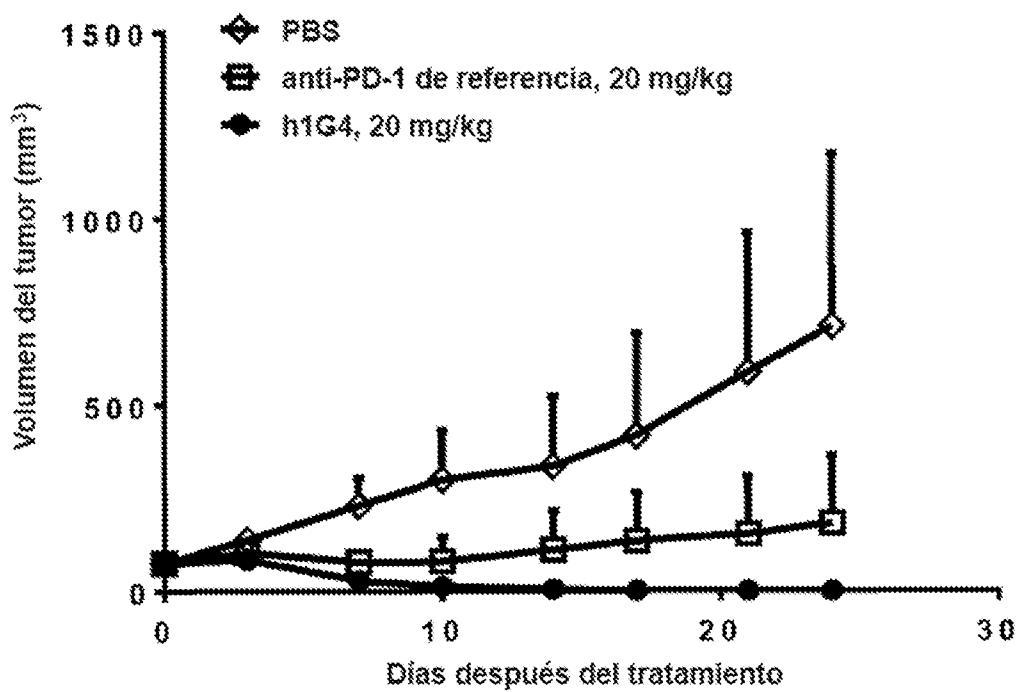


Figura 17

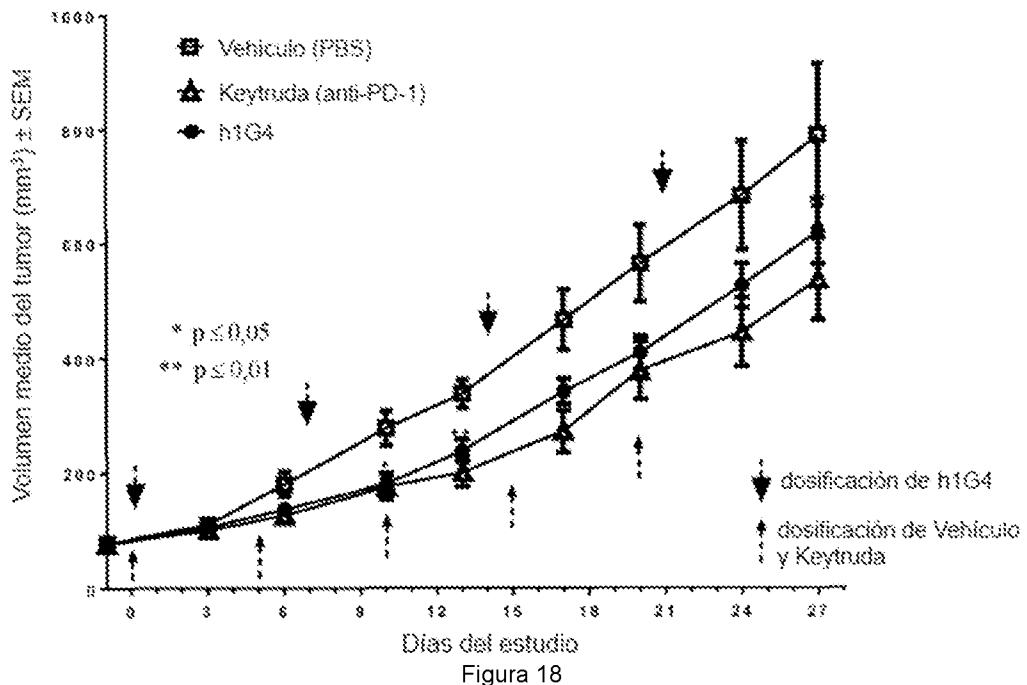


Figura 18

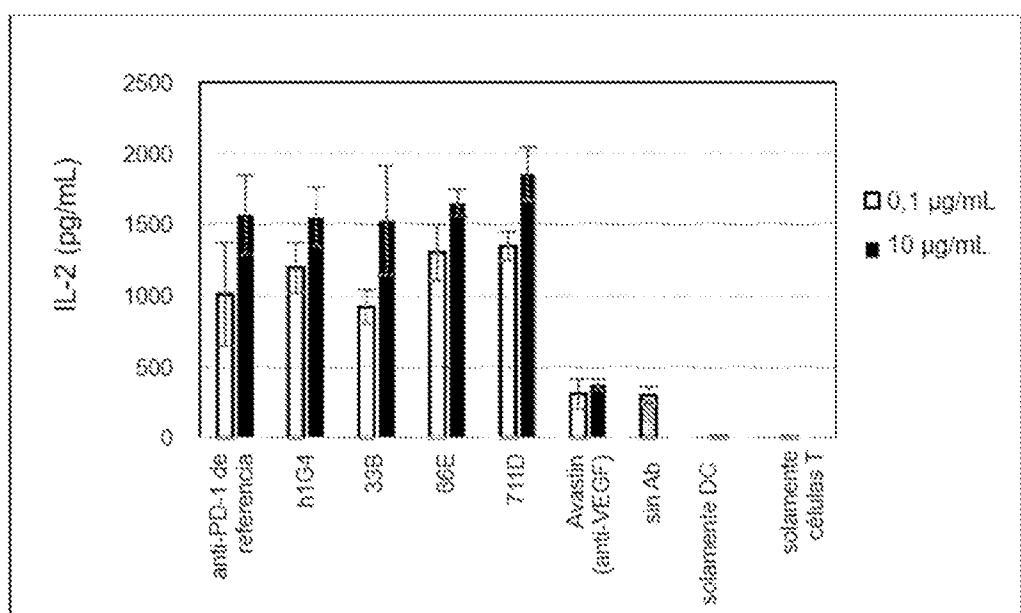


Figura 19A

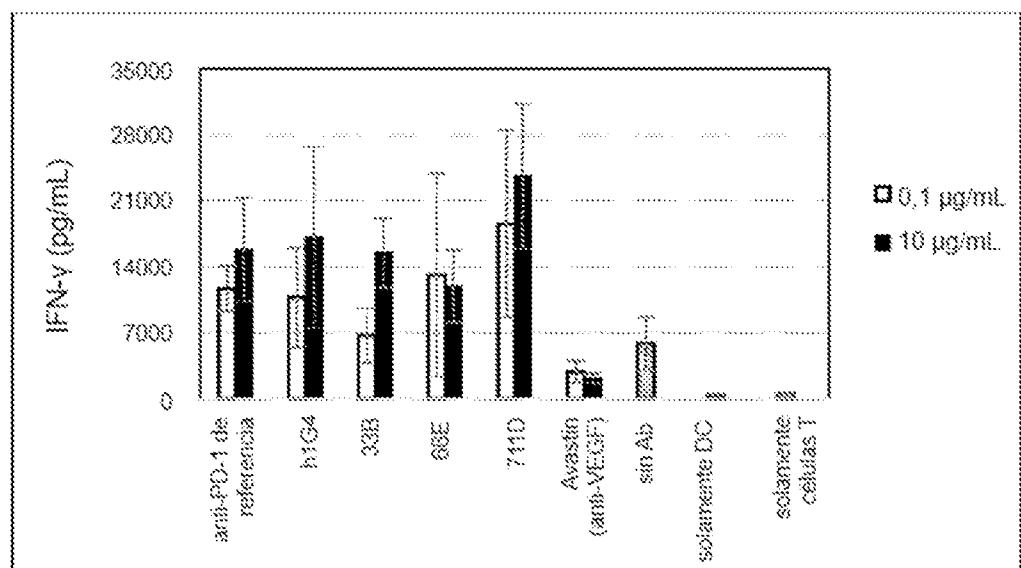
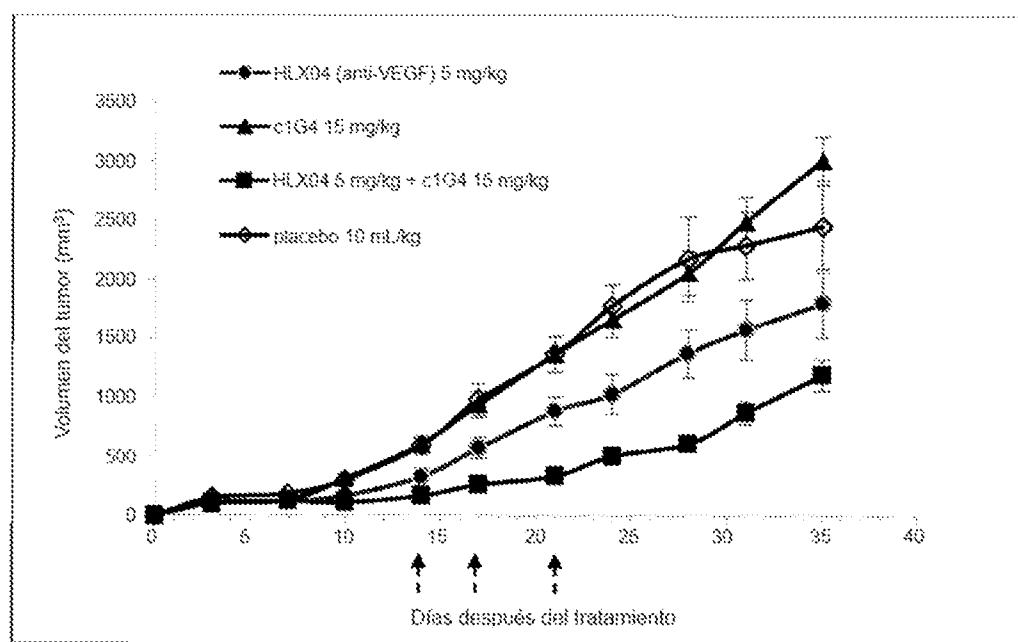
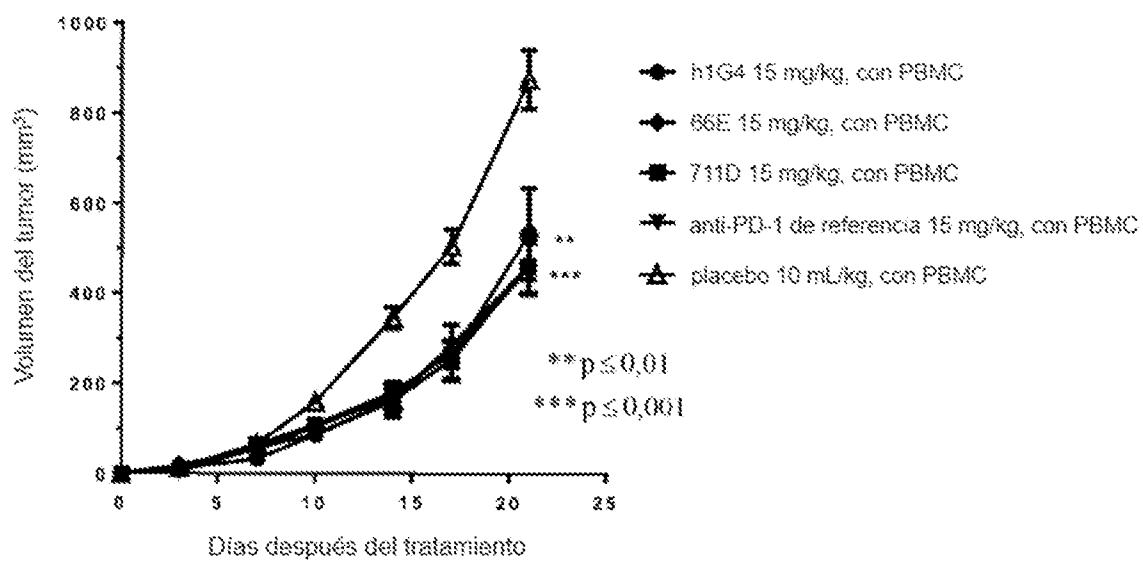
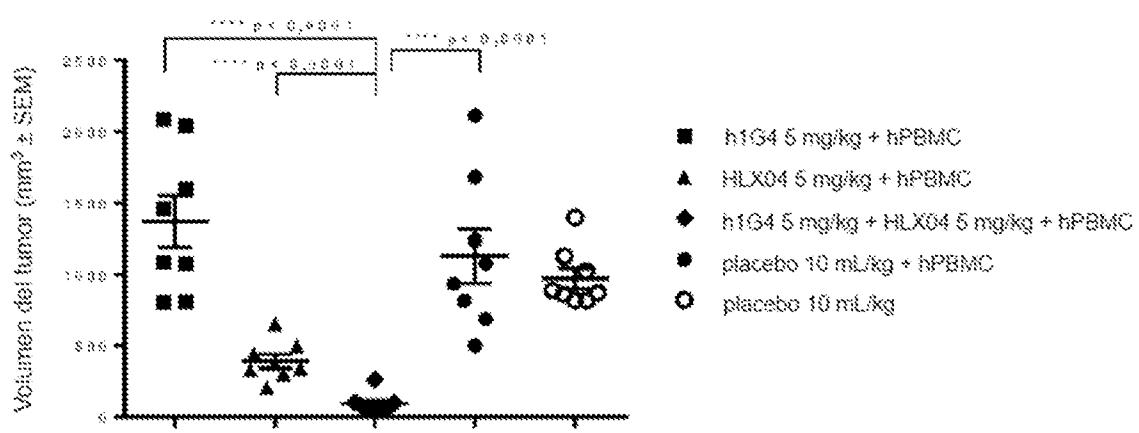
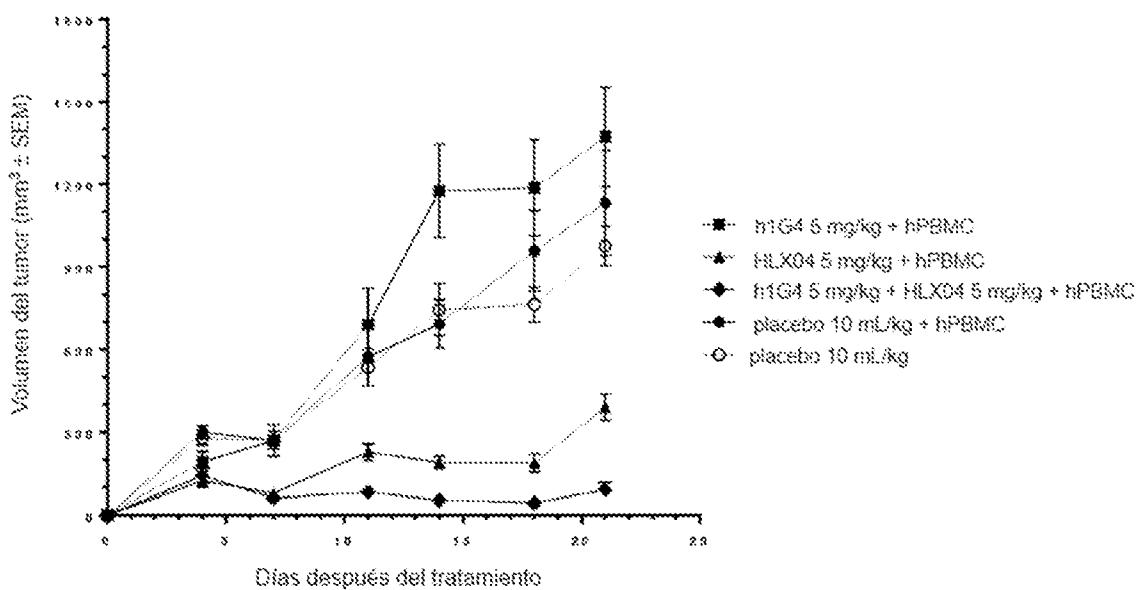
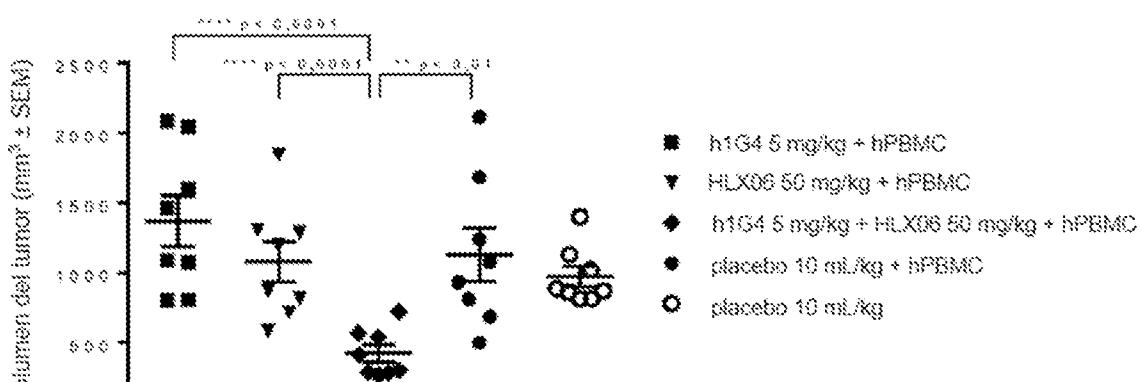
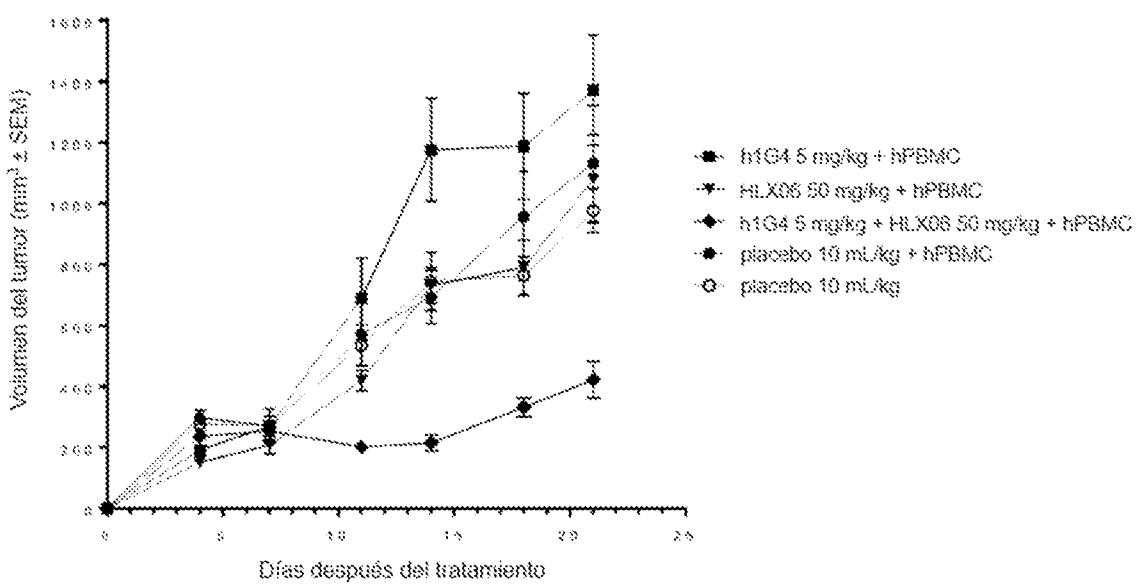
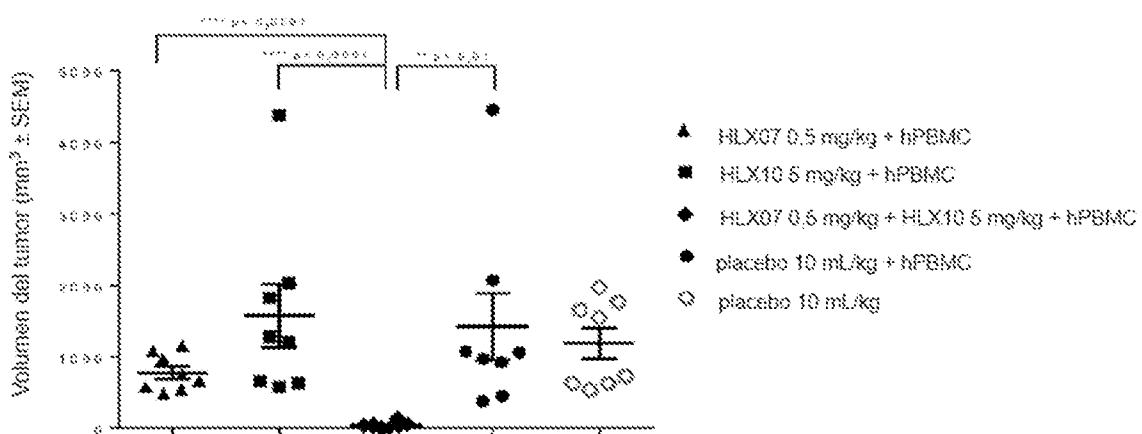
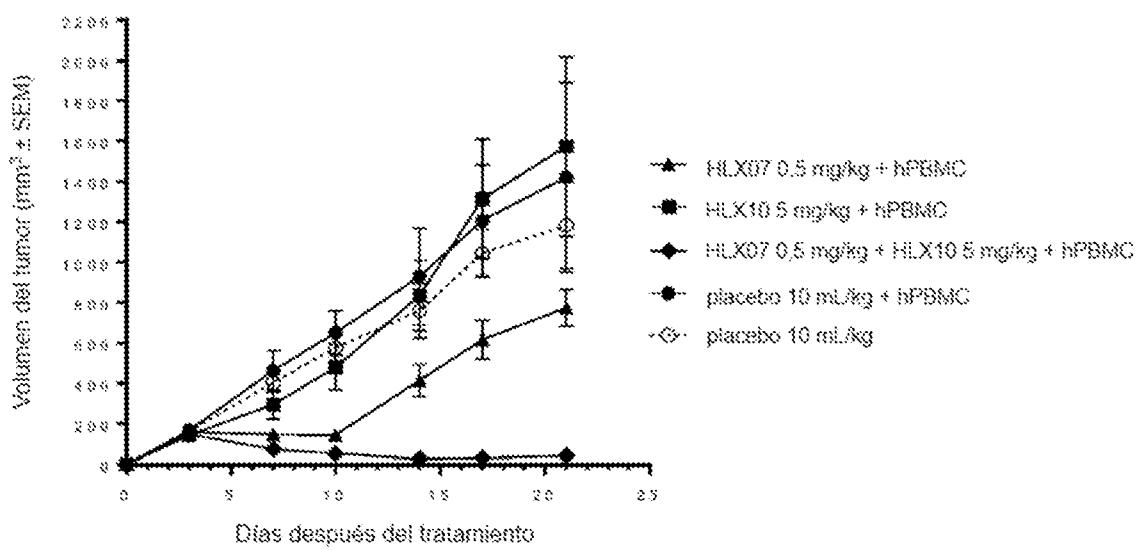


Figura 19B









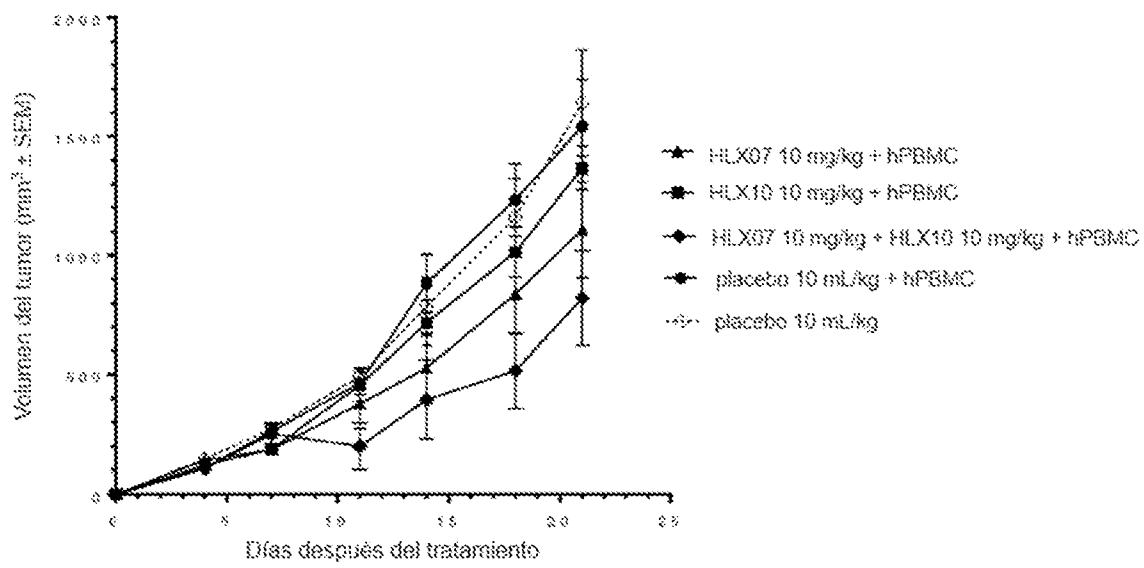


Figura 25A

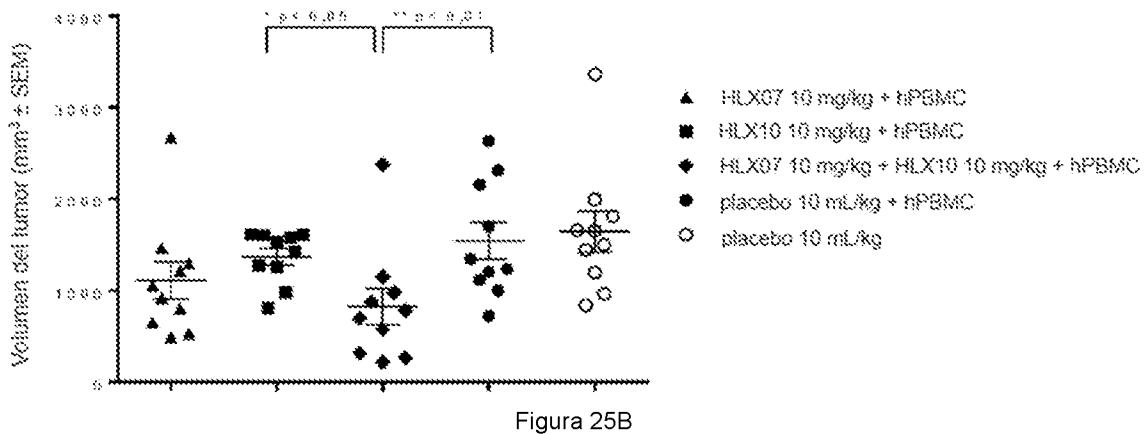


Figura 25B