

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 252**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2019** **PCT/US2019/019786**
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2019** **WO19168947**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2019** **E 19759945 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023** **EP 3758735**

54 Título: **Proteínas bifuncionales que combinan bloqueo de puntos de control para terapia dirigida**

30 Prioridad:

28.02.2018 US 201862636825 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2024

73 Titular/es:

AP BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
17F, No. 3, Yuanqu St. Nangang Dist.
Taipei City, 115, TW

72 Inventor/es:

HER, JENG-HORNG;
YOU, JHONG-JHE;
HSU, CHING-HSUAN y
HUANG, PO-LIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 974 252 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

Proteínas bifuncionales que combinan bloqueo de puntos de control para terapia dirigida

5 Antecedentes

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a una proteína de fusión bifuncional. Más particularmente, la presente invención se refiere al anticuerpo para la terapia del cáncer.

Descripción del estado del arte relacionado

15 Los dos tipos principales de linfocitos en humanos son T (derivados del timo) y B (derivados de la médula ósea). Estas células se derivan de células madre hematopoyéticas de la médula ósea y del hígado fetal que están muy comprometidas con la vía de desarrollo linfóide. La progenie de estas células madre sigue vías divergentes para madurar y convertirse en linfocitos B o T. El desarrollo de los linfocitos B humanos tiene lugar íntegramente dentro de la médula ósea. Las células T, por otro lado, se desarrollan a partir de precursores inmaduros que abandonan la médula y viajan a través del torrente sanguíneo hasta el timo, donde proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros.

20 Células T

Las células T son las células asesinas inmunitarias más abundantes (aproximadamente el 75% de los linfocitos sanguíneos) y potentes. El papel de las células T efectoras en la respuesta inmune antitumoral está fuertemente respaldado por estudios *in vitro* y la observación de que una alta infiltración de células T CD8⁺ en varios tipos de tumores se correlaciona con un pronóstico clínico favorable (Fridman et al., 2012). La activación de células T efectoras no modificadas requiere al menos tres señales complementarias: (i) interacción TCR-CD3/Ag-MHC con la ayuda de correceptores (CD4 o CD8); (ii) unión de moléculas coestimuladoras tales como CD80 o CD86 a CD28, CD40/CD40L; y (iii) moléculas accesorias como las citoquinas.

30 La coestimulación o el suministro de dos señales distintas a las células T es un modelo ampliamente aceptado de activación linfocitaria de linfocitos T en reposo mediante células presentadoras de antígeno (APC) (Lafferty y Cunningham, 1975). Este modelo prevé además la discriminación entre lo propio y lo no propio y la tolerancia inmune (Bretscher y Cohn, 1970; Bretscher, 1999; Jenkins y Schwartz, 1987). La señal primaria, o señal específica de antígeno, se transduce a través del receptor de células T (TCR) tras el reconocimiento del péptido antigénico extraño presentado en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La segunda señal o coestimuladora se suministra a las células T mediante moléculas coestimuladoras expresadas en células presentadoras de antígeno (APC) e induce a las células T a promover la expansión clonal, la secreción de citoquinas y la función efectora (Lenschow et al., 1996). En ausencia de coestimulación, las células T pueden volverse refractarias a la estimulación antigénica, no generar una respuesta inmune efectiva y, además, pueden provocar agotamiento o tolerancia a antígenos extraños.

45 El documento WO2017136562 enseña anticuerpos biespecíficos que comprenden anticuerpos que reconocen PD-L1 y VEGF, pero no construcciones que comprenden péptidos del VEGFR.

El documento WO2017181079 también enseña dichas construcciones biespecíficas y menciona el uso de construcciones trampa de VEGF que podrían usarse como alternativas funcionales al anticuerpo anti-VEGF.

50 Proteína de punto de control inmunitario: PD-L1

Los puntos de control inmunitario se refieren a un grupo de vías inhibitoras y estimuladoras iniciadas principalmente por la interacción ligando-receptor que conecta el sistema inmunológico, específicamente la inmunidad mediada por células T, para mantener la tolerancia propia y modular la duración y amplitud de las respuestas fisiológicas en los tejidos periféricos para minimizar los daños tisulares colaterales normalmente (Pardoll, 2012). Las células tumorales cooptan ciertas vías de puntos de control como un mecanismo importante de resistencia inmune. Por ejemplo, el ligando de la proteína 1 de muerte celular programada, PD-L1, comúnmente está sobreexpresado en la superficie de las células tumorales de los cánceres humanos. La interacción de PD-L1 con su receptor, PD-1, expresado en linfocitos infiltrados tumorales (TIL), específicamente en células T, inhibe la respuesta local mediada por células T para escapar de la vigilancia inmune (Liang et al., 2006; Sznol y Chen, 2013). Por lo tanto, la inhibición de señales inmunosupresoras en las células cancerosas, o la estimulación agonística directa de las células T, da como resultado y/o induce una fuerte respuesta inmune antitumoral sostenida. Estudios clínicos recientes sugirieron firmemente que el bloqueo de las proteínas de los puntos de control inmunitario a través de anticuerpos o modulado por ligandos o receptores solubles son los enfoques más prometedores para activar la inmunidad antitumoral terapéutica (Topalian et al., 2014). Actualmente, la FDA ha aprobado anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) para tratar enfermedades como los melanomas.

Angiogénesis y dominio de inhibición de VEGF (VID)

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, es un proceso normal y vital implicado en el desarrollo fetal y la reparación de tejidos. El proceso está altamente regulado por factores angiogénicos y antiangiogénicos e implica migración y proliferación de células endoteliales, maduración y remodelación de vasos y degradación de la matriz extracelular. Aunque es un proceso importante en el crecimiento y desarrollo normales, la angiogénesis también juega un papel clave en el crecimiento tumoral. Los tumores requieren un suministro vascular para crecer y pueden lograrlo mediante la expresión de factores de crecimiento proangiogénicos, incluidos miembros de la familia de ligandos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Hicklin y Ellis, 2005). Cuando el VEGF y otros factores de crecimiento endotelial se unen a sus receptores en las células endoteliales, se inician señales dentro de estas células que promueven el crecimiento y la supervivencia de nuevos vasos sanguíneos. El bloqueo de la actividad del VEGF con anticuerpos específicos del VEGF (Avastin), receptores solubles del VEGF (aflibercept) o inhibidores de la actividad tirosina quinasa del VEGF (sunitinib) son estrategias que se han utilizado para tratar trastornos tumorales o de tipo angiogénico, como la AMD.

Anticuerpo biespecífico/bifuncional

La idea de usar anticuerpos biespecíficos para redirigir eficientemente células inmunitarias efectoras hacia células tumorales surgió en la década de 1980 (Karpovsky et al., 1984; Perez et al., 1985; Staerz et al., 1985). Las estructuras biespecíficas generalmente se clasifican en dos grupos principales con diferentes propiedades farmacocinéticas, basadas en la ausencia o presencia de un fragmento Fc, moléculas similares a IgG y pequeños formatos biespecíficos recombinantes, la mayoría de ellos derivados de un fragmento variable de cadena única (scFv). Debido a su tamaño compacto, los fragmentos de anticuerpos generalmente penetran los tumores de manera más eficiente que las moléculas similares a IgG, pero este beneficio se ve mitigado por una vida media sérica corta (unas pocas horas) que limita su absorción tumoral general y el tiempo de residencia (Goldenberg et al., 2007). Por el contrario, la presencia de un fragmento Fc, que se une a los receptores Fc neonatales, proporciona una vida media sérica prolongada (>10 días) a los formatos similares a IgG, favoreciendo la captación y retención tumoral, pero limita la penetración tumoral.

Estudios recientes han destacado la eficacia terapéutica de la inmunoterapia, una clase de tratamientos contra el cáncer que utilizan el propio sistema inmunológico del paciente para destruir las células cancerosas. Dentro de un tumor, la presencia de una familia de moléculas reguladoras negativas, conocidas colectivamente como "inhibidores de puntos de control", puede inhibir la función de las células T para suprimir la inmunidad antitumoral. Los inhibidores de puntos de control, tales como CTLA-4 y PD-1, atenúan la proliferación de células T y la producción de citocinas. El bloqueo dirigido de CTLA-4 o PD-1 con anticuerpos monoclonales antagonistas (mAb) libera los "frenos" de las células T para estimular la inmunidad antitumoral. Además, estudios recientes han informado sobre las asociaciones entre las vías PD-L1 o PD-L2/PD-1 y genes proangiogénicos, incluidos los factores inducibles por hipoxia (HIF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en varias neoplasias malignas, como el linfoma de Hodgkin clásico (cHL) (Koh et al., 2017) y glioma (Xue et al., 2017). Koh et al., confirmó las correlaciones positivas entre PD-L1, VEGF o MVD. Sus hallazgos proporcionaron evidencia que respalda nuevos enfoques terapéuticos que incluyen combinaciones de terapia anti-PD-L1/PD-1 y anti-VEGF además del régimen estándar actual para cHL (Koh et al., 2017). El VEGF también demostró su capacidad para interrumpir una etapa clave en el ciclo de inmunidad del cáncer: la infiltración de células T en el tumor (Kim y Chen, 2016; Terme et al., 2012). El direccionamiento de VEGF puede ayudar a restaurar parte del ciclo de inmunidad contra el cáncer al aumentar la infiltración de células T en el microambiente del tumor (Hughes et al., 2016; Terme et al., 2012; Wallin et al., 2016). La inhibición de la vía del VEGF puede conducir a una mayor expresión de moléculas de adhesión celular en las células endoteliales, aumentando las células T intratumorales para crear un microambiente tumoral inflamado inmune.

Resumen

La presente divulgación está diseñada para investigar el anticuerpo biespecífico con intención inmunomoduladora e inhibición de la angiogénesis para el tratamiento de pacientes con cánceres, tales como cáncer de próstata, cáncer de pulmón, NSCLC, melanoma, linfoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, RCC, o cáncer de ovario fueron examinados.

El objetivo de la invención se resuelve mediante las reivindicaciones independientes. Otros aspectos se divulgan en las reivindicaciones subordinadas. La presente divulgación proporciona una proteína de fusión bifuncional o una porción de unión a antígeno de la misma que comprende al menos una de las cadenas polipeptídicas, en donde la cadena polipeptídica comprende: un dominio de unión que se une a una proteína de la superficie celular, en donde el dominio de unión se une al ligando de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-L1), y el dominio de unión comprende: un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden respectivamente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la SEQ ID NO. 4 y el aminoácido 1-111 de la SEQ ID NO. 3; y la SEQ ID NO. 6 y el aminoácido 1-110 de la SEQ ID NO. 5; y un dominio inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs. 1, 2, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y una combinación de las mismas.

En una realización, la proteína de fusión bifuncional o su porción de unión a antígeno comprende, además: un dominio Fc; y un fragmento Fab conectado al extremo terminal N del dominio Fc, y el fragmento Fab que comprende el dominio de unión, en el que el dominio inhibidor de VEGF está conectado al extremo terminal C del dominio Fc.

En una realización, la proteína de fusión bifuncional o su porción de unión a antígeno comprende además un conector entre el dominio Fc y el dominio inhibidor de VEGF.

En una realización, la proteína de fusión bifuncional comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 12 o 13.

En una realización, la proteína de fusión bifuncional o su porción de unión a antígeno comprende un par de cadenas polipeptídicas.

En una realización, la proteína de fusión bifuncional es un anticuerpo IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY.

En una realización, la proteína de fusión bifuncional es un anticuerpo IgG.

En una realización, el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En una realización, el anticuerpo IgG1 es una reducción de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos del anticuerpo IgG1.

En una realización, la proteína de fusión bifuncional es un anticuerpo humano.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende: una proteína de fusión bifuncional o una porción de unión a antígeno de la misma como se mencionó anteriormente, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación también proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende: un agente terapéutico; y una proteína de fusión bifuncional o una porción de unión a antígeno de la misma como se mencionó anteriormente, en donde el agente terapéutico está conjugado covalentemente a la proteína de fusión bifuncional o su porción de unión a antígeno mediante un conector.

En una realización, la proteína de fusión bifuncional o una porción de unión a antígeno de la misma se selecciona de la proteína de fusión bifuncional o una porción de unión a antígeno de la misma como se mencionó anteriormente.

En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), melanoma, linfoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales (RCC) y cáncer de ovario.

En una realización, la cantidad eficaz es de 0.001 µg/kg a 250 mg/kg.

La presente divulgación también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión bifuncional o la porción de unión a antígeno de la misma como se mencionó anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La invención se puede comprender mejor leyendo la siguiente descripción detallada de la realización, con referencia a los dibujos adjuntos, como sigue:

La Fig. 1 muestra puntos de control inmunitarios que modulan la inmunidad mediada por células T. Se podrían utilizar anticuerpos agonistas o antagonistas contra los puntos de control, tales como anti-ICOS, anti-CD28, anti-OX40 y anti-CD27, o anti-PD-1, anti-CTLA4, anti-LAG3, anti-BTLA, para construir la proteína de fusión bifuncional dependiendo de las aplicaciones.

Las Figs. 2A y 2B muestran la detección de clones de fagos mediante ELISA directo para PD-L1 recombinante.

La Fig. 3 muestra anticuerpos purificados específicos para PD-L1 mediante SDS-PAGE sin reducción para revelar la integridad y pureza.

La Fig. 4 muestra ejemplos de la actividad de unión directa al ligando de proteínas de puntos de control antiinmunes purificadas y anticuerpos anti-PD-L1 frente a PD-L1. Los pocillos recubiertos previamente con ligando se incubaron primero con diversas concentraciones de anticuerpos como se indica. Las proteínas unidas se detectaron luego con anticuerpo específico de Fab anti-IgG humano de cabra conjugado con HRP y se representaron gráficamente las lecturas de OD₄₅₀.

La Fig. 5 muestra el análisis de flujo utilizando células 293 de expresión de PD-L1. Las células HEK293 con expresión de PD-L1 se incubaron primero con anticuerpos purificados y los anticuerpos unidos se detectaron con anti-IgG humana de cabra conjugada con Alexa-488 (H+L), seguido de un análisis del clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

La Fig. 6 muestra el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 con anticuerpos anti-PD-L1 purificados. Los anticuerpos purificados como se indica se aplicaron con PD-L1-Fc biotinilado y PD-1/His recubierto previamente en una placa de 96 pocillos para evaluar la actividad de inhibición de la interacción PD-1/PD-L1. La unión de PD-L1-Fc recombinante a PD-1 recombinante se detectó mediante estreptavidina-HRP y análisis mediante ELISA.

Las Figs. 7A y 7B muestran que los anticuerpos anti-PD-L1 con 1 o 10 µg/mL estimulan la producción de IL-2 y/o IFN-γ en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) después de 3 días (Fig. 7A) o 5 días (Fig. 7B) de tratamiento con anticuerpos.

La Fig. 8 muestra la estructura de un Fc de cadena pesada de anticuerpo fusionada con el dominio de inhibición de VEGF (VID) del receptor de VEGF.

La Fig. 9 muestra ejemplos de análisis en gel PAGE de anticuerpos anti-punto de control inmunitario-anticuerpos biespecíficos VID. Se demostró que las proteínas de fusión purificadas, los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1-VID tienen un peso molecular de aproximadamente 220 kDa (no reductor), y la fusión de la cadena pesada tiene aproximadamente 85 kDa y la cadena ligera es de aproximadamente 25 kDa (reducida) en ambas fusiones de anticuerpos. M es marcador, el carril 1 es anti-PD-L1-VID/elgG1 no reducido, el carril 2 es anti-PD-L1-VID/elgG1 reducido, el carril 3 es anti-PD-L1-VID/IgG4 no reducido, y el carril 4 es anti-PD-L1-VID/IgG4 reducido. Cada uno de los carriles carga 3 µg.

Las Figs. 10A y 10B muestran la pureza de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1-VID/IgG4 (Fig. 10A) y anti-PD-L1-VID/elgG1 (Fig. 10B) purificados de células HEK293 mediante análisis SEC-HPLC.

Las Figs. 11A y 11B muestran ejemplos de la actividad de unión de PD-L1 (Fig. 11A) y VEGF₁₆₅ (Fig. 11B) de anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1-VID purificados mediante ELISA directo. Los pocillos recubiertos previamente con ligando se incubaron primero con diversas concentraciones de muestras de prueba como se indica. Los Ab unidos se detectaron luego con anticuerpo específico Fc o F(ab')₂ anti-IgG humano de cabra conjugado con HRP y se representaron gráficamente las lecturas de OD₄₅₀.

La Fig. 12 muestra la inhibición de la proliferación de HUVEC estimulada por VEGF₁₆₅ mediante anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1-VID purificados. Se incubaron previamente VEGF₁₆₅ con muestras de prueba como se indica durante un día y luego se aplicaron a las células HUVEC para controlar la proliferación de células HUVEC estimuladas por VEGF₁₆₅. Después de 3 días de cultivo, se determinó la proliferación celular mediante el reactivo MTS (Promega). La absorbancia se representó frente a la concentración de Ab de la muestra de prueba y se determinó la concentración a la que se inhibía la proliferación celular en un 50% (IC₅₀).

Las Figs. 13A y 13B muestran que el anticuerpo biespecífico estimula sinérgicamente la activación de células T para la producción de IL-2 (Fig. 13A) e IFN-γ (Fig. 13B) en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) después de 3 o 5 días con isotipo IgG, anticuerpo de referencia (MPDL3280A) o tratamiento con anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID/elgG1.

Las Figs. 14A, 14B y 14C muestran la estabilidad sérica *in vitro* del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID/elgG1 de diferentes especies (Fig. 14A: suero humano; Fig. 14B: suero de ratón; Fig. 14C: suero de Cyno). El anticuerpo purificado se incubó en suero (15 µg/mL) de diferentes especies como se indica a 37 °C durante 1, 2, 3, 5, 7 y 14 días. Después de la incubación, las muestras recolectadas se aplicaron a un ensayo ELISA tipo sándwich para determinar la actividad de unión relativa para PD-L1 y VEGF₁₆₅. La vida media se representó gráficamente en función de la concentración de anticuerpo biespecífico en suero.

La Fig. 15A es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID/elgG1 y el tratamiento con anticuerpo monoclonal sobre el crecimiento del tumor PC-3 en ratones Fox Chase SCID®Beige. La Fig. 15B muestra que el tratamiento con anticuerpos biespecíficos del tamaño del tumor es significativamente menor que el tratamiento con anticuerpos de isotipo o de referencia el día 35 después de la inoculación.

Las Figs. 16A, 16B y 16C muestran que los Ab anti-PD-L1-VID mantienen su especificidad de unión al antígeno en comparación con anti-PD-L1 solo en A549 estimulado con IFN-γ (Fig. 16A), NCI-H292 (Fig. 16B), o célula 293 con expresión estable de PD-L1 (Fig. 16C); MFI: intensidad media de fluorescencia.

Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a las presentes realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se utilizan los mismos números de referencia en los dibujos y en la descripción para hacer referencia a piezas iguales o similares.

La presente invención describe la expresión, purificación y caracterización de proteínas bifuncionales con un dominio de inhibición de VEGF funcional aislado en el extremo terminal C del dominio Fc de anticuerpos de la proteína de punto de control antiinmunitario. Estas proteínas interactúan con su correspondiente diana de punto de control y transmitirán la señal inhibidora para modular la inmunidad de las células T involucradas y neutralizarán la angiogénesis inducida por VEGF al mismo tiempo. Los componentes de las proteínas de fusión Fc en la presente invención son de todos los orígenes humanos y, por lo tanto, se espera que no sean inmunogénicos y puedan usarse como compuestos terapéuticos en humanos.

Las moléculas biespecíficas tales como los anticuerpos biespecíficos (BsAb) proporcionan un medio para dirigirse simultáneamente a múltiples epítomos en la misma diana molecular o en diferentes dianas con un único agente terapéutico. Como compuestos terapéuticos contra el cáncer, tienen el potencial de conferir actividades novedosas o más potentes, reducir el costo de los productos y facilitar el desarrollo de nuevos regímenes terapéuticos en contraste con una mezcla de dos mAb (Chames y Baty, 2009; Hollander, 2009; Thakur y Lum, 2010). Recientemente, catumaxomab, un anticuerpo biespecífico trifuncional dirigido a la molécula de adhesión de células epiteliales humanas (EpCAM) y CD3, ha demostrado un claro beneficio clínico en pacientes con carcinomatosis peritoneal de cánceres epiteliales (Heiss et al., 2010) y una interacción biespecífica de células T (BiTE) con especificidad dual para CD19 y CD3 también ha demostrado una actividad clínica alentadora en pacientes con CD19 que expresan neoplasias malignas hematológicas (Bargou et al., 2008). A pesar del gran interés en el desarrollo de moléculas biespecíficas como compuestos terapéuticos contra el cáncer, los desafíos técnicos en la producción de moléculas biespecíficas estables y activas han obstaculizado en el pasado la evaluación clínica de la mayoría de los formatos biespecíficos. Muchos formatos de anticuerpos modificados, incluido un anticuerpo biespecífico similar a IgG, tienen una estabilidad o solubilidad comprometida (Bargou et al., 2008; Demarest y Glaser, 2008; Lu et al., 2005). Además, se han adoptado varias estrategias para aumentar la calidad del producto y la estabilidad *in vivo* de moléculas biespecíficas, incluida la PEGilación, la conjugación con albúmina sérica humana y la modificación de Fc (Muller et al., 2007; Ridgway et al., 1996). Los anticuerpos biespecíficos de la forma general descrita anteriormente tienen la ventaja de que la secuencia de nucleótidos que codifica los dos dominios V, un único conector o un espaciador puede incorporarse en un organismo de expresión huésped adecuado bajo el control de un único promotor. Esto aumenta la flexibilidad con la que se pueden diseñar estas construcciones, así como el grado de control del experimentador durante su producción. Además, el Fc de IgG es otra estructura atractiva para diseñar nuevas terapias porque contiene todas las funciones del anticuerpo excepto la capacidad de unión. La modificación de Fc es importante para mejorar la eficacia de los anticuerpos biespecíficos. Por lo tanto, la conformación basada en IgG se utiliza en la presente invención para dos dianas independientes en células inmunitarias o proteínas proangiogénicas en la terapia contra el cáncer.

El direccionamiento de las proteínas de los puntos de control inmunitario son enfoques prometedores para activar la inmunidad antitumoral. Las proteínas anti-puntos de control, tales como PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG3, etc., actualmente se evalúan clínicamente (Fig. 1). Se ha demostrado que los datos preliminares con bloqueadores de proteínas de puntos de control inmunitario pueden mejorar la inmunidad antitumoral con el potencial de producir respuestas clínicas duraderas. Sin embargo, a pesar de la notable eficacia clínica de estos agentes en una serie de tumores malignos, ha quedado claro que no son suficientemente activos para muchos pacientes. Numerosas vías inmunomoduladoras adicionales, así como factores inhibidores expresados o secretados por células mieloides y estromales en el microambiente tumoral, son dianas potenciales para crear sinergia con el bloqueo de los puntos de control inmunitario. Por lo tanto, combinar terapias anticancerígenas o con anticuerpos biespecíficos ha sido fundamental para conseguir la remisión completa y la cura de los pacientes con cáncer. Mientras tanto, ya se sabe que el direccionamiento de VEGF reduce la angiogénesis por tumor (Hicklin y Ellis, 2005) y puede ayudar a restaurar parte del ciclo de inmunidad del cáncer al aumentar la infiltración de células T en el microambiente del tumor (Hughes et al., 2016; Terme et al., 2012; Wallin et al., 2016).

El dominio de unión a ligando extracelular (SEQ ID NOs. 1 y 2) de un receptor de VEGF humano es capaz de unirse a un ligando de VEGF, y comprende uno o más de los dominios tipo Ig D1-D7 (Tabla 1) de uno o más receptores de VEGF. Preferiblemente, el dominio de unión al ligando extracelular del receptor de VEGF comprende un dominio D2 similar a Ig de un primer receptor de VEGF y un dominio D3 similar a Ig de un segundo receptor de VEGF, en donde el primer y segundo receptores de VEGF son receptores de VEGF iguales o diferentes. En la presente invención, el dominio de inhibición de VEGF (VID), el dominio de unión al ligando extracelular del receptor de VEGF, comprende un dominio D2 similar a Ig de un VEGFR1 y un dominio D3 similar a Ig de un VEGFR2 para bloquear el VEGF y reducir la angiogénesis.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de dominios similares a Ig de receptores de VEGF humanos

Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia
D1 del receptor 1 de VEGF humano	14	PELSLKGTQHIMQAGQTLHLQCRGEAAHK WSLPENMVSKESESLITKSA
D2 del receptor 1 de VEGF humano	15	GRELVIPCRVTSNITVTLKKFPLDTLPDG KRIIWDSSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVN GH
D3 del receptor 1 de VEGF humano	16	IDVQISTPRPVKLLRGHTLVNCTATTPLNT RVQMTWSPDEKNKRASVRRRIDQSNH ANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPS FKSVNTSVH
D4 del receptor 1 de VEGF humano	17	TVKHKRQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFF SPEVWVWKDGLPATEKSARYLTRGYSLIK DVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFKNLTAT
D5 humano	18	POIVEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAY
Receptor 1 de VEGF		GIPQPTIKWFWHPCHNNHSEARCDSCSN NEESFILDADSNMGNRIESTQRMAIEGKN KMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRN ISFYIT
D6 del receptor 1 de VEGF humano	19	PNGFHVNLKMPTEGEDLKLCTVKNFLY RDVTWILLRTVNNRTMHYSISKQKMAITKE HSITLNLTIMNVSLQDSGTACRARNVYTG EEILQ
D7 del receptor 1 de VEGF humano	20	PYLLRNLSDHVTAISSSTLTDCHANGVPEP QITWFKNNHKIGQEPGILGPGSSTLFIERV TEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYLT
D1 del receptor 2 de VEGF humano	21	NTTLQITCRGQRDLWLWPNNGSGSEQR VEVTECSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKC FYRETDL
D2 del receptor 2 de VEGF humano	22	NKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRF VPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAGMVF CEAKINDE
D3 del receptor 2 de VEGF humano	23	YDVVLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELN VGIDFNWEYPSKQHQHKKLVNRDLKTQSG SEMKKFLSTLTDGVTRSDQGLYTCAASS GLMTKKNST
D4 del receptor 2 de VEGF humano	24	FVAFSGMESLVEATVGERVRIPAKYLG PPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEV SERDTGNYTVILTNPKSEKQSHVVS
D5 del receptor 2 de VEGF humano	25	PQIGEKSLISPVDSYQYGTTLCTVYAI PPHHIHWWYQLEEECANEPSQAVSVTNP YPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIE GKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVG RGERVISFHT
D6 del receptor 2 de VEGF humano	26	PEITLOPDMQPTGESVSLWCTADRSTFE NLTWYKLGPOPLPIHVGEPLTPVCKNLDTL WKLNATMFSNSTNDILMELKNASLQDQG DYVCLAQDRKTKKRHCVRQLT
D7 del receptor 2 de VEGF humano	27	PTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPP QIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRR VRKEDEGLYTCQACSVLGCCKVEAFFI

El dominio inhibidor de VEGF que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs. 1, 2, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y una combinación de los mismos. En algunos ejemplos de referencia, el dominio inhibidor de VEGF comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente un 95 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente.

La presente invención describe la construcción, expresión y caracterización del anticuerpo Fc de la proteína anti-punto de control inmunitario fusionado con el dominio de inhibición de VEGF (VID) del receptor de VEGF humano. El anticuerpo anti-PD-L1 posicionado en el extremo terminal N en construcciones de fusión permitirá expandir el poder de las proteínas de fusión más allá del agente potenciador inmunológico si la contraparte de fusión se reemplaza por otros puntos de control inmunitarios, tal como anticuerpos anti-CTLA-4, CD3, OX40 o molécula dirigida a la superficie celular, tal como anticuerpos anti-EGFR, anti-HER2, anti-CD40, por ejemplo.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo biespecífico o una porción de unión a antígeno del mismo, que comprende un dominio de unión que se une a una proteína de la superficie celular; y un dominio inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El dominio de unión que une PD-L1 comprende: un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera. El dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs. 4 y 6. En algunos ejemplos de referencia, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 85 %, 90 % o 95 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se mencionó anteriormente. El dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 1-111 de la SEQ ID NO. 3 y 1-110 de la SEQ ID NO. 5. En algunos ejemplos de referencia, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de al menos

aproximadamente 85 %, 90 % o 95 % de homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se mencionó anteriormente.

Generación de anticuerpos a partir de la biblioteca OmniMab

Para la generación de anticuerpos terapéuticos contra PD-L1, se llevaron a cabo selecciones con la biblioteca de fagémidos OmniMab. La biblioteca de fagémidos es generada por AP Biosciences Inc. (APBio Inc.) a partir de una colección de más de cien células B de donantes sanos. Hyperphage (M13K07ΔpIII, Progen, Heidelberg, Alemania) preparó los fagos para la primera ronda de análisis. Se aplicaron análisis en fase sólida y análisis de células contra PD-L1 para la selección y el aislamiento del aglutinante específico de PD-L1 de la biblioteca OmniMab. La selección en fase sólida se realizó utilizando PD-L1-Fc humano recombinante (APBio Inc.) en la primera ronda de selección y luego se usaron células HEK293 expresadas con PD-L1 para dos rondas adicionales de enriquecimiento. Después de tres rondas de selección, los aglutinantes específicos de PD-L1 se seleccionaron y aislaron mediante ELISA directo con la proteína recombinante correspondiente (Figs. 2A y 2B). Las proteínas recombinantes PD-L1-Fc previamente recubiertas se transfirieron con sobrenadante que contenía fagos rescatados durante 1 hora y se lavaron con PBS que contenía Tween-20 al 0.1 % tres veces. Los fagos unidos se detectaron mediante anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Roche) y se usó sustrato TMB para el desarrollo de la señal. Se registraron las lecturas de OD₄₅₀. Los aglutinantes positivos se aislaron y se enviaron para secuenciación para confirmar la secuencia y diversidad de la cadena pesada y la cadena ligera. La región variable de cadena pesada y cadena ligera específica de PD-L1 se describió a partir de la SEQ ID NO. 3 a la SEQ ID NO. 6: la SEQ ID NO. 3 es la cadena ligera del clon 6 de PD-L1, SEQ ID NO. 4 es la región variable de la cadena pesada del clon 6 de PD-L1, SEQ ID NO. 5 es la cadena ligera del clon 32 de PD-L1, SEQ ID NO. 6 es la región variable de la cadena pesada del clon 32 de PD-L1. Como se muestra en las Figs. 2A y 2B, se aislaron varios clones y se sabe que se reconocen específicamente para el antígeno correspondiente como control negativo blanco de comparación.

Subclonación y expresión/purificación del aglutinante específico de PD-L1 seleccionado como formato de IgG

Para facilitar la detección rápida de aglutinantes específicos con funcionalidad en la activación de células T, las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de aglutinantes positivos contra PD-L1 mediante ELISA se amplificaron, digirieron y subclonaron en un vector de expresión de IgG especializado APBio que porta la región constante de IgG4 (SEQ ID NO. 7). Después de la validación de la secuencia, los plásmidos se prepararon y transfectaron en células HEK293 para la expresión de anticuerpos con reactivo de transfecciónfectina 293 (Invitrogen). Después de 4 días de cultivo, el anticuerpo secretado en un medio libre de suero se purifica por afinidad a partir del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía de proteína G. Luego se concentra el anticuerpo purificado, seguido de diálisis en tampón de PBS. La concentración final de proteína dializada se determina mediante espectrofotómetro NanoDrop2000 y la pureza e integridad se determinan mediante SDS-PAGE sin reactivo reductor como se muestra en la Fig. 3. La integridad de varios anticuerpos purificados es normal en las células HEK293, así como en el anticuerpo de referencia, MPDL3280A.

Determinación de la actividad de unión para candidatos de IgG específicos de PD-L1 mediante ELISA directo

Después se aplicaron candidatos a anticuerpos purificados contra PD-L1 (candidatos a anticuerpos anti-PD-L1) para la caracterización de unión mediante ELISA en PD-L1-Fc humano en una configuración recubierta directamente. La Fig. 4 mostró el resultado de unión de ELISA para anticuerpos anti-PD-L1. Para los anticuerpos específicos de PD-L1, la mayoría de los candidatos potenciales mostraron una actividad de unión similar o mejor con el anticuerpo de referencia (Ab Ref, MPDL3280A, Roche).

La quimera PD-L1 IgG1 Fc humana purificada (PD-L1-Fc, APBio) se dializó en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se ajustó a 1 mg/mL y luego se diluyó con PBS hasta una concentración final de 1 µg/mL. Se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc-Immuno Maxisorp con 0.1 mL por pocillo de quimera PD-L1-Fc recombinante, dejando pocillos vacíos para controles de unión no específicos y se incubaron a 4°C durante la noche. Se eliminó la solución de quimera PD-L1-Fc y las placas se lavaron tres veces con 0.4 mL de tampón de lavado (Tween-20 al 0.1 % en PBS). Se agregaron 0.4 mL de tampón de bloqueo (leche en polvo baja en grasa al 5 % en PBS) a todos los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con mezcla. Se eliminó el tampón de bloqueo y las placas se lavaron tres veces con 0.4 mL de tampón de lavado. Se prepararon diluciones en serie de los anticuerpos de prueba PD-L1 en PBS y se agregaron 0.1 mL de Ab diluido por pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se eliminó la solución de anticuerpos y las placas se lavaron tres veces con 0.4 mL de tampón de lavado por pocillo. Se diluyó 1:2000 con PBS y se añadió 0.1 mL por pocillo de anticuerpo F(ab')₂ específico de F(ab')₂, anti-IgG humano de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immunoresearch #109-036-097). Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron con 0.4 mL de tampón de lavado por pocillo. Se agregaron 0.1 mL de reactivo TMB (Invitrogen) y se incubó durante 1 a 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 0.05 mL de HCl 1 N y se leyó la absorbancia a 450 nm en un Bio-Tek Spectra. La EC₅₀ calculada para los candidatos a anticuerpos anti-PD-L1 para PD-L1 mostró que la mayoría de los candidatos poseen una buena actividad de unión, así como MPDL3280A (Ab Ref) mediante ELISA directo (Fig. 4).

Determinación de la actividad de unión para candidatos de IgG específicos de PD-L1 mediante FACS

También se aplicaron candidatos a anticuerpos purificados (candidatos a anticuerpos anti-PD-L1) para citometría de flujo para determinar y comparar la actividad de unión con células HEK293 expresadas en PD-L1. La Fig. 5 muestra la actividad de unión de los anticuerpos correspondientes indicados por FACS con células HEK293 expresadas en PD-L1 en forma estable.

El análisis FACS de células 293 de expresión estable de PD-L1 células teñidas con candidatos a anticuerpos anti-PD-L1 para examinar la actividad de unión de PD-L1, las células de expresión estable se incubaron con 1 µg/mL de candidatos a anticuerpos anti-PD-L1 purificados, anticuerpo de referencia (Ab Ref MPDL3280A) o con anticuerpo isotipo como control negativo en hielo durante 1 hora. Las células se lavaron tres veces con 1 x PBS y luego se incubaron con IgG antihumano de cabra conjugado con Alexa-488 (H+L) (Invitrogen Inc.) en hielo durante 1 hora adicional. Después de la tinción, las células se lavaron tres veces con PBS 1x, se resuspendieron en PBS 1x/FBS al 2% antes de analizarlas mediante FACS Calibur (BD Biosciences, Inc.) y FlowJo (TreeStar, LLC). Como se muestra en la Fig. 5, la mayoría de los candidatos a anticuerpos anti-PD-L1 poseen una buena actividad de unión, así como el anticuerpo de referencia. Esto indicó que los clones de fagos seleccionados de la biblioteca OmniMab efectivamente reconocen el PD-L1 nativo en las células.

Unión de competición de ligandos (ensayo de ELISA)

Se mostro para los candidatos a anticuerpos el ensayo de selectividad y afinidad de unión usado para evaluar los candidatos a anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención en cuanto a su capacidad para bloquear la unión de PD-L1 a PD-1.

Se ensayó la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de la quimera PD-L1-Fc humana (PD-L1-Fc) a PD-1/His humana recombinante (hPD-1/His) mediante ELISA. Se dializó hPD-1/His (APBio) recombinante purificado hasta 1 mg/mL en PBS y luego se conjugó con biotina (Abcam). Se recubrió una placa de 96 pocillos Nunc Maxisorp con 250 ng de hPD-1/His por pocillo en PBS durante la noche. Se eliminó la solución de hPD-1/His y las placas se lavaron tres veces con 0.4 mL de tampón de lavado (Tween-20 al 0.1 % en PBS). Se agregaron 0.4 mL de tampón de bloqueo (leche en polvo baja en grasa al 5 % en PBS) a todos los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con mezcla. Durante la etapa de bloqueo, las reservas de anticuerpos se diluyeron en un intervalo de 200 nM a 0 nM en PBS con una dilución en serie de 2 veces. La quimera PD-L1-Fc biotinilada recombinante purificada se diluyó hasta 4 µg/mL en PBS. Las placas recubiertas con PD-1/His se lavaron tres veces con 0.2 mL de tampón de lavado (Tween 20 al 0.1% en PBS). Se añadieron diluciones de anticuerpos de 60 µL (candidatos a anticuerpos anti-PD-L1 o Ab Ref MPDL3280A) solos con 60 µL de quimera PD-L1-Fc biotinilada y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron como se describió anteriormente. Se diluyó estreptavidina-HRP 1:2000 en PBS, se añadieron 100 µL de la solución resultante a los pocillos del plato lavado y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron como se describió anteriormente, se agregaron 100 µL de solución de sustrato TMB a cada pocillo y se incubaron durante 10 minutos. La reacción se detuvo con 50 µL de HCl 1 N y se leyó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector Bio-Tek y se muestra en la Fig. 6. Se ha demostrado que los candidatos parciales de anticuerpos inhiben la interacción entre PD-1-PD-L1 mediante ELISA de competición. La mayoría de los candidatos a anticuerpos revelaron una actividad de bloqueo similar en comparación con el anticuerpo de referencia (Ab Ref MPDL3280A).

Estimulación mejorada de la activación de las células T mediante la inhibición de la interacción del ligando PD-1:PD-L1 para el anticuerpo anti-PD-L1

La vía de señalización de PD-1 inhibe las señales coestimuladoras moderadas de TCR/CD28, reduciéndose primero la producción de citoquinas sin una disminución en la proliferación de células T. A medida que las señales coestimuladoras de TCR/CD28 se debilitan, domina la vía PD-1, con una gran reducción en la producción de citocinas acompañada de una reducción en la proliferación. En consecuencia, para confirmar que la inhibición de PD-1 mediante la inhibición de la interacción con PD-L1, los anticuerpos humanos de la invención mejoran la activación de las células T, se realizan reacciones mixtas de linfocitos (MLR).

Se enriquecieron monocitos de sangre completa humana con cóctel de enriquecimiento de monocitos humanos RosetteSep™ (Cat. No. 15068) y se cultivaron en medio de diferenciación, RPMI 1640 con FBS al 10 %, 100 ng/mL (1000 U/mL) de GM-CSF, 100 ng/mL (500 U/mL) durante 6 días. La diferenciación de células dendríticas (DC) de monocitos se verificó mediante DC-SIGN-PE, anti-CD14 conjugado con Ab FITC, anti-CD83 conjugado con Ab PE o anti-CD80 conjugado con Ab FITC para validar la diferenciación y solía ser APC en MLR.

Se aislaron células T CD4⁺ alogénicas de sangre entera humana mediante el cóctel de enriquecimiento de células T CD4⁺ humanas RosetteSep™ (Cat. No. 15062). La pureza de las células T CD4⁺ se comprobó con Ab APC conjugado con anti-CD4 para garantizar que la pureza sea superior al 95% y luego se marcaron con CFSE 1 µM (kit de proliferación celular CFSE CellTrace™, Life technologies, Cat. No. C34554) para el ensayo de proliferación de células T. Se usaron células T CD4⁺ marcadas para cultivar juntamente con DC inmaduras con diferentes candidatos a anticuerpos como se indica durante 3 y 5 días para ver si los candidatos a anticuerpos podían restaurar la activación de las células T mediante el bloqueo de la interacción entre PD-1 y PD-L1. Después de 3 y 5 días de incubación, el sobrenadante se recogió para cuantificar citocinas, tales como IL-2 e IFN-γ mediante ELISA. Se predice que la adición

de candidatos a anticuerpos anti-PD-L1 (clones 6, 32, 28, 51, 64, 27 y 37) a cultivos de células dendríticas inmaduras más células T alogénicas dará como resultado un aumento en la proliferación de células T y producción de citoquinas, en comparación con los cultivos tratados con el isotipo IgG (iso#1, #2) y se muestra en las Fig. 7A y 7B. La producción de IL-2 e IFN- γ aumenta significativamente en las MLR en comparación con el tratamiento con anticuerpos isotipo después de 3 días (Fig. 7A) o 5 días (Fig. 7B) de tratamiento con anticuerpos, especialmente para el clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1. El incremento de citocinas sigue siendo evidente después de 5 días de tratamiento con anticuerpos y es similar al anticuerpo de referencia (ref), MPDL3280A. Esto indicó que el clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1 debería ser uno de los posibles candidatos para el compuesto de anticuerpos biespecíficos.

Construcción, expresión y purificación del anticuerpo anti-PD-L1-VID.

Dado que el biespecífico está diseñado como basado en IgG fusionado con un dominio de inhibición de VEGF, el clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1 se asigna para ser la forma de IgG, por otro lado, el dominio de unión a VEGF, D1 y D2, en el receptor de VEGF está fusionado en el extremo terminal C de la región Fc en el anticuerpo del clon 6 anti-PD-L1. Dado que el isotipo Fc o el Fc modificado es importante para mejorar la eficacia o la producción de anticuerpos biespecíficos en células de mamíferos; por lo tanto, se usaron dos isotipos de Fc diferentes, IgG4 (SEQ ID NO. 7) e IgG1 modificado (elG1, reducción de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), SEQ ID NO. 8) para la construcción del biespecífico. En la Fig. 8 se representó la construcción del anticuerpo Fc anti-PD-L1 biespecífico fusionado con VID (SEQ ID NO. 9). Se colocó un conector peptídico corto y flexible, (GGGGS)₃ (SEQ ID NO. 10) entre, por ejemplo, el extremo terminal C de la cadena pesada del anticuerpo anti-PD-L1 de la región Fc (SEQ ID NO. 4) y el módulo del extremo terminal N de VID para asegurar el plegado correcto y minimizar el impedimento estérico. Las secuencias codificantes de la cadena pesada anti-PD-L1-VID para IgG4 y elG1 se muestran en la SEQ ID NO. 12 y NO. 13. Las proteínas de fusión Fc construidas del anticuerpo fueron lideradas por un péptido señal (SEQ ID NO. 11) y expresadas por células de mamífero, y purificadas a partir del sobrenadante del cultivo celular transfectado mediante cromatografía de Proteína G de 1 etapa. Como se muestra en la Fig. 9, se puede obtener una pureza superior al 95 % en un proceso de purificación de una sola etapa y muestra que las proteínas de fusión purificadas tienen el peso molecular correcto (Pm = 220 kDa). Dado que la baja pureza o tasa de recuperación es el principal problema para la producción de anticuerpos biespecíficos o proteínas de fusión en la producción química, de fabricación y de controles (CMC); por lo tanto, ambos anticuerpos biespecíficos purificados también se aplicaron a una columna de elución por tamaño (SEC) con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para evaluar la pureza de los anticuerpos biespecíficos (Figs. 10A y 10B). Ambos anticuerpos biespecíficos, ya sea anti-PD-L1-VID/IgG4 (Fig. 10A) o anti-PD-L1-VID/elG1 (Fig. 10B), revelaron que la pureza es superior al 99% en el análisis por SEC-HPLC. Implicaba que el formato podría procesarse fácilmente en el desarrollo de CMC y proporcionar una tasa de éxito en el desarrollo posterior.

Como se muestra en la Fig. 8, la estructura del anticuerpo anti-punto de control inmunitario Fc fusionado terminalmente con VID. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser anticuerpos inhibidores anti-punto de control inmunitario, tales como anti-PD-L1, anti-PD-1, anti-CTLA4, anti-LAG3, etc., o anticuerpos estimuladores, tales como anti-CD28, anti-CD137, anti-CD27, anti-ICOS, etc. o receptor/antígeno de la superficie celular, tal como HER2, EGFR, etc. Se coloca un conector entre el anticuerpo Fc y VID para generar el anticuerpo biespecífico.

Afinidad de unión de las proteínas de fusión a PD-L1 y VEGF₁₆₅

Se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de unión directa (ELISA) para medir la afinidad de unión de los anticuerpos biespecíficos a PD-L1 o VEGF₁₆₅, una variante de empalme de VEGF-A. Se utilizó una proteína de captura de VEGF recombinante (VEGFR-Fc) y el clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1 parental como control positivo 1 para PD-L1 y VEGF, respectivamente. VEGFR-Fc, aflibercept, es un receptor de VEGF soluble que fue diseñado para uso terapéutico y actualmente está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU. para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). VEGFR-Fc contiene el segundo dominio similar a Ig (D2) de VEGFR1 fusionado con el tercer dominio similar a Ig (D3) de VEGFR2 fusionado con la región Fc de IgG1 humano (Holash et al., 2002).

Se añadieron 100 μ L de una solución de recubrimiento (1 μ g/mL de VEGF₁₆₅ en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.2) a cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos y la placa se incubó durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron dos veces con 400 μ L de tampón de PBS y el exceso de líquido se eliminó cuidadosamente con una toalla de papel. Se añadieron a cada pocillo 400 μ L de una solución de bloqueo (leche desnatada al 5 % en PBS) y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron dos veces con tampón de PBS. Las muestras de anticuerpos biespecíficos y de control se diluyeron en serie tres veces en una solución de bloqueo, con la concentración de proteína más alta de 100 nM. Se agregaron a cada pocillo 100 μ L de las muestras diluidas en serie. La placa se cubrió y se incubó en un agitador de placas (aproximadamente 100 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tween-20 al 0.05% en PBS). Se añadieron a cada pocillo 100 μ L de anticuerpos específicos de Fc anti-IgG humano de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante diluidos 1:2500 en solución de bloqueo. Las placas se sellaron y se incubaron en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 μ L de sustrato TMB a cada pocillo y las placas se incubaron durante 3 a 5 minutos para permitir que tuviera lugar la reacción. Para detener la reacción, se agregaron a cada pocillo 100 μ L de solución de parada (HCl 1

N). La densidad óptica (OD) de cada pocillo se determinó utilizando un lector de placas ELISA (Bio-Tek) a una longitud de onda de absorbancia de 450 nm. La absorbancia se representó frente a la concentración de proteína de la proteína de fusión o del control, y se determinó la concentración a la que la señal era la mitad de la concentración efectiva máxima (EC50). Mientras tanto, la actividad de unión de PD-L1 para ambos anticuerpos biespecíficos también se realizó como un escenario similar al descrito anteriormente, excepto que los anticuerpos biespecíficos unidos se detectaron mediante anticuerpo F(ab')₂ específico de F(ab')₂, anti-IgG humano de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante.

Como se muestran en los datos de la Fig. 11A, la afinidad de unión, expresada como el valor de EC50, fue de 0.075 tanto para los anticuerpos anti-PD-L1-VID/IgG4 como para los anticuerpos anti-PD-L1-VID/elgG1 para proteína PD-L1 recombinante. Ambos anticuerpos biespecíficos poseen una actividad de unión comparativa, así como un control positivo, anticuerpo del clon 6 anti-PD-L1 (0.1 nM). Mientras tanto, también se registró el resultado de la prueba de actividad de unión de VEGF. Como se muestran en los datos de la Fig. 11B, ambos anticuerpos biespecíficos mostraron una actividad de unión a VEGF similar en comparación con el control positivo, VEGFR-Fc (aflibercept). La actividad de unión no se ve afectada en ambos anticuerpos biespecíficos ni para PD-L1 ni para la actividad de unión de VEGF.

Inhibición de la proliferación de HUVEC por los anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1-VID

Se llevó a cabo un ensayo de proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) para probar la funcionalidad del anticuerpo biespecífico de la invención. Se usó VEGFR-Fc como control positivo como se describió anteriormente. Se añadieron 100 µL de una solución de recubrimiento (gelatina al 1% en agua bidestilada) a cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos y la placa se incubó durante 2 horas o durante la noche a 37 °C. Los pocillos se lavaron dos veces con tampón de PBS. Se añadieron a cada pocillo 3500 células de células HUVEC en medio de crecimiento de células endoteliales y la placa se incubó durante la noche a 37 °C. Las muestras como se indica se diluyeron en tampón de ensayo (sales de Earle 1x, Medio 199, suero bovino fetal al 10 %, HEPES 10 mM, antibiótico/antimicótico 1x), con una concentración de proteína más alta de 30 nM. Las muestras se mezclaron con VEGF₁₆₅ (8 ng/mL) y las mezclas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Luego se lavaron los pocillos con 200 µL de PBS. Se añadieron 100 µL de VEGF₁₆₅/mezcla de muestra a cada pocillo y las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Después de la incubación, se agregaron 10 µL de reactivo de detección MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfenil)-2H-tetrazolio)+metosulfato de fenacina en PBS destilado a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 2.5 horas. La OD de cada pocillo se determinó utilizando un lector de placas de ELISA (Bio-Tek) a una longitud de onda de absorbancia de 490 nm. Se representó la absorbancia frente a la concentración de proteínas de la muestra de prueba y se determinó la concentración a la que se inhibía la proliferación celular en un 50% (IC50). Se determinó que la inhibición de la proliferación celular (IC50) estaba entre 0.1070 y 0.1233 nM para las proteínas de fusión probadas de la invención. Uno de los anticuerpos biespecíficos, anti-PD-L1-VID/elgG1, reveló una mejor inhibición que otro anticuerpo biespecífico, anti-PD-L1-VID/IgG4 (Fig. 12, 0.1070 nM frente a 0.1233 nM). La IC50 de anti-PD-L1-VID/elgG1 es buena, así como la del control positivo, VEGFR-Fc (0.1072 nM).

Estimulación mejorada de la activación de células T para candidatos a anticuerpos biespecíficos anti-PD-L1-VID/elgG1 en MLR

Determinación de la funcionalidad antagonista del anticuerpo biespecífico para mejorar la activación de las células T mediante la inhibición de la interacción entre PD-1 y PD-L1. Los candidatos a anticuerpos biespecíficos, anticuerpo anti-PD-L1-VID/elgG1, se aplicaron en MLR como se describió anteriormente. Luego se registró la producción de IL-2 e IFN-γ después de 3 o 5 días de tratamiento con anticuerpos. Se aplicó anticuerpo mono o biespecífico como un mol igual para comparar la funcionalidad antagonista en la mejora de la activación de las células T y se usó el isotipo IgG como control negativo. Como los datos mostrados en las Figs. 13A y 13B, el anticuerpo anti-PD-L1-VID/elgG1 mostró una inducción significativa de IL2 después de 3 días de tratamiento y disminuyó después de 5 días de tratamiento. El perfil de producción de citoquinas es muy similar al del anticuerpo de referencia, MPDL3280A. Mientras tanto, la producción de IFN-γ también está sobrerregulada y se acumula en el tratamiento con candidatos a anticuerpos biespecíficos después de 3 o 5 días de tratamiento. Esto indicó que el anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID/elgG1 también posee funcionalidad antagonista en la activación de células T, así como el anticuerpo de referencia sin pérdida de ninguna actividad en la presente invención.

Estabilidad sérica *in vitro* del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID/elgG1

Se incubaron anti-PD-L1-VID/elgG1 purificados con suero (15 µg/mL) de diferentes especies como se indica a 37 °C en baño de agua. Se tomaron muestras de suero que contenían los anticuerpos biespecíficos purificados en diferentes momentos hasta los 14 días. Las concentraciones del anticuerpo biespecífico en las muestras de suero se determinarán utilizando un ensayo ELISA tipo sándwich como se muestra a continuación. Se incubaron pocillos previamente recubiertos con VEGF₁₆₅ (1 µg/mL) con concentraciones tituladas de anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID/elgG1 purificado para ser la curva estándar para calcular la concentración de Ab en el suero (preparación fresca, día 0). También se aplicaron muestras recolectadas de diferentes puntos de tiempo a pocillos de VEGF₁₆₅ recubiertos previamente para su detección. Después de lavar con Tween-20 al 0.1 % en PBS, los Ab intactos y unidos se

detectaron mediante PD-L1-Fc biotinilado y estreptavidina conjugada con HRP antes de que se desarrollara el color. La concentración de los Ab en el suero se calculó mediante el método de interpolación y luego se representa gráficamente la vida media de los Ab como se muestra en las Figs. 14A, 14B y 14C. La vida media de anti-PD-L1-VID/elgG1 es superior a 8 días en suero de cynomolgus (8.6 días), de ratón (9.2 días) o humano (11.9 días). La larga vida media podría proporcionar flexibilidad de uso del anticuerpo biespecífico con una menor frecuencia de administración en estudios con animales o ensayos clínicos en el futuro.

Actividad antitumoral del anticuerpo biespecífico (modelo *in vivo*)

La falta de reactividad cruzada de PD-L1 en roedores en anticuerpos biespecíficos impidió el uso de modelos tumorales de xenoinjerto humano o singénico murino estándar para la evaluación de la eficacia antitumoral humana de los anticuerpos. En consecuencia, se generó un nuevo modelo de ratón con tumor xenogénico huPBL-SCID-Bg utilizando un ratón SCID-Bg (CB.17/lcr.Cg Prkdc^{scid}Lyst^{tg}/CrI), que alberga la falta de mutación beige (Bg) de linfocitos T y B murinos y células NK funcionales. La eficacia antitumoral humana de los anticuerpos biespecíficos se evaluó utilizando este modelo como se describe a continuación.

La próstata humana PC-3 se obtuvo de la American Type Culture Collection y se cultivó en RPMI-1640 (Invitrogen) con L-glutamina, piruvato sódico, penicilina/estreptomicina y suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor (FBS, Gibco Cat. No. 10437). Las células se cultivaron hasta confluencia en matraces Falcon T-150. Posteriormente, las células se tripsinizaron (tripsina 0.25% -EDTA; Invitrogen) y el crecimiento se amplió hasta un número de células suficiente para la inoculación. Se aislaron linfocitos de sangre periférica (PBMC) de sangre heparinizada usando Lymphoprep™ de acuerdo con el protocolo del fabricante (STEMCELL Technologies Inc.). Las suspensiones de células contadas se combinaron de manera que cada ratón recibió una inyección de 0.75×10^6 PBMC y 3×10^6 células tumorales en una única inyección en bolo de 0.1 mL en PBS. Para facilitar el crecimiento de las células tumorales en el ratón, se mezclaron otros 0.1 mL de matrigel con la suspensión celular combinada y luego se inyectó inmediatamente en los ratones preparados.

Para cada ratón, se inyectaron por vía subcutánea 0.2 mL de volumen de la suspensión celular combinada en el flanco derecho del animal. Después de 7 días de inoculación, se forma el tumor sólido y alcanza alrededor de $\sim 100 \text{ mm}^3$ y el anticuerpo biespecífico (10 mg/kg) o el anticuerpo de control se administra dos veces por semana durante tres a cuatro semanas con una inyección intraperitoneal (i.p.). La medición del tumor se realizó mediante un calibrador Pressier dos veces por semana, así como la administración de la muestra de prueba durante la duración de los experimentos y también se registraron los pesos corporales. El volumen del tumor se calculó usando el siguiente cálculo: $\text{largo} \times \text{ancho}^2 \times 0.44 = \text{volumen (mm}^3\text{)}$ y se representó en la Fig. 15A. Los ratones fueron retirados del estudio en el caso de que el volumen del tumor alcanzara 2000 mm^3 o que el animal perdiera el 20 % de su peso corporal antes de terminar el experimento. Se observaron resultados similares cuando se midieron los tumores el día 7 después de la inoculación y los animales se dividieron aleatoriamente de acuerdo con el volumen del tumor. Para el estudio con animales, cada grupo estaba formado por 6 ratones. Como muestran los datos en la Fig. 15A, el anticuerpo biespecífico mostró una eficacia antitumoral significativa en el modelo de ratón xenoinjertado con PC-3. El tamaño del tumor es más pequeño después de 18 días después de la inoculación del tumor, así como del anticuerpo de referencia PD-L1 y continuó reduciéndose por debajo de 200 mm^3 . La Fig. 15B muestra que el tratamiento con anticuerpos biespecíficos del tamaño del tumor es significativamente menor que el tratamiento con anticuerpos de isotipo o de referencia el día 35 después de la inoculación. Indicó que los Ab anti-PD-L1-VID/elgG1 tienen un efecto sinérgico en la actividad antitumoral en animales. Se demostró preliminarmente que el modelo de ratón xenoinjertado con PC-3 es un anticuerpo biespecífico antitumoral y se reveló su potencial para ser un candidato a fármaco terapéutico en el futuro.

En conjunto, estos resultados indicaron que el anticuerpo biespecífico mantiene el bloqueo de su punto de control inmunitario en la señalización de PD-1/PD-L1 y neutraliza la proteína proangiogénica, VEGF. Se están realizando estudios para investigar más a fondo la actividad biológica de estas proteínas utilizando un modelo animal adecuado, tal como el tumor PC-3 en el modelo humanizado NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tmLwjl}/SzJ (NSG).

La región Fc en la presente invención podría ser de cualquier isotipo, subclase, alotipo o mutante modificado de inmunoglobulina, tal como fragmento(s) Fc de botón en ojal.

Ejemplos

El siguiente ejemplo describe la generación de anticuerpos monoclonales adecuados para fines terapéuticos dirigidos a PD-L1 y VEGF humanos. Se generaron dominios neutralizados compuestos, humanos anti-PD-L1 y VEGF humanos a partir del clon 6 del anticuerpo anti-PD-L1 y el dominio de captura de VEGF de receptores de VEGF humanos, respectivamente. Los segmentos de la secuencia de la región V humana se obtuvieron de bases de datos de secuencias de anticuerpos humanos no relacionados (línea germinal y no germinal).

Ejemplo 1 Generación de anticuerpos IgG que se unen a PD-L1 y VEGF

Ciertos anticuerpos proporcionados por la presente invención se generaron originalmente a partir de la unión de Fab a PD-L1 humano. Los Fab se seleccionaron de una biblioteca de presentación en fagos, la biblioteca de fagémidos

OmniMab, luego de una selección alterna de las proteínas de fusión Fc correspondientes (PD-L1-Fc) y células que expresan la proteína humana correspondiente (PD-L1). Después de la detección por ELISA directo, los clones positivos se secuenciaron para determinar la cadena pesada y la cadena ligera. Estos Fab incluían aquellos designados como "OM-PD-L1-6" y "OM-PD-L1-32", etc. para PD-L1. Los anticuerpos PD-L1 PD-L1-Clon 6 y PD-L1-Clon 32 divulgados en esta solicitud se generaron a partir de "OM-PD-L1-6" y "OM-PD-L1-32" en células HEK293 o células CHO-S. Y el anticuerpo biespecífico dirigido simultáneamente a PD-L1 y VEGF se diseñó como anticuerpo anti-PD-L1-VID (dominio de inhibición de VEGF). La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de un Fab dado son idénticas a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada, respectivamente.

Ejemplo 2 Unión in vitro de anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID a su diana correspondiente

Se construyó el anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID como se muestra en la Fig. 8 y se expresó en las células HEK293 o células CHO-S. El medio que contenía el anticuerpo biespecífico se purificó por afinidad a partir del sobrenadante del cultivo mediante cromatografía con proteína G. Luego se concentra el anticuerpo purificado, seguido de diálisis en tampón de PBS y se analiza mediante SDS-PAGE como se muestra en la Fig. 9. Para probar la unión directa de proteínas de fusión purificadas a PD-L1 o VEGF₁₆₅ en ELISA, se recubrieron 100 ng/pocillo de PD-L1 recombinante en una placa de ELISA de 96 pocillos. Luego se agregaron a cada pocillo varias concentraciones de Ab anti-PD-L1-VID purificados y se incubaron durante 1 hora. Después del lavado, se añadió a cada pocillo una dilución 1:5000 de conjugado anti-Fab o anti-Fc HRP (Jackson Immunochemicals) y se incubó durante otra hora. Después del lavado final, se añadió sustrato TMB (Invitrogen Inc.) y se midió la absorbancia de DO a 450 nm. Se calculan los datos analizados mediante ajuste de curva sigmoidea utilizando GraphPad Prism 5 y EC50.

Ejemplo 3 Especificidad de unión al antígeno de anti-PD-L1-VID mediante análisis FACS

Para probar la especificidad de unión de Ab anti-PD-L1-VID, se tiñeron células 293 que expresan PD-L1 en forma estable (células de riñón embrionario humano), A549 estimuladas con IFN- γ (carcinoma de pulmón) o NCI-H292 (carcinoma pulmonar mucoepidermoide) a una dilución en serie de 3 veces de anticuerpos Ab anti-PD-L1-VID 30 nM durante 1 hora en hielo antes de lavar tres veces con PBS 1x. Las proteínas de fusión de anticuerpos unidas se detectaron con IgG de cabra conjugado con Alexa-488 (H+L) seguido de análisis FACS. Se utilizó anticuerpo isotipo como control negativo para la prueba. Los resultados mostraron que los Ab anti-PD-L1-VID mantienen su especificidad de unión al antígeno en comparación con anti-PD-L1 solo (Figs. 16A, 16B y 16C).

Ejemplo 4 Efecto inmunomodulador in vitro del anticuerpo biespecífico anti-PD-L1-VID

Para medir la capacidad de los Ab anti-PD-L1-VID para modular la capacidad de respuesta de las células T, las células T purificadas se cultivarán con células dendríticas alogénicas, preparadas cultivando monocitos en GM-CSF e IL-4 durante unos días. Se configuraron placas paralelas para permitir la recolección de sobrenadantes el día 3 y el día 5 para medir IL-2 e IFN- γ respectivamente usando un kit ELISA comercial. El anti-PD-L1 humanizado de Genentech/Roche, MPDL3280A, se producirá internamente y se utilizará como control positivo. Como los datos mostrados en las Figs. 13A y 13B, la producción de IL2 e IFN- γ está altamente sobreexpresada en el tratamiento con anticuerpo biespecífico, así como con el anticuerpo de referencia después de 3 o 5 días de tratamiento con anticuerpo. Reveló que el anticuerpo biespecífico todavía posee la capacidad de inhibir la interacción PD-1/PD-L1 entre las células T y las células dendríticas para activar la actividad de las células T.

Ejemplo 5 Expansión de leucocitos humanos inducida por anticuerpos biespecíficos *in vivo*

La falta de reactividad cruzada detectable del anticuerpo PD-L1 con PD-L1 murino y el requisito de la presencia de células inmunes humanas requirieron el desarrollo de modelos para la evaluación funcional *in vivo* de los anticuerpos biespecíficos. Los ratones con antecedentes genéticos NOD que portan la mutación de inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y la deficiencia en la cadena gamma común del receptor de IL-2 (comúnmente denominada NSG) son capaces de soportar el injerto de una gran cantidad de leucocitos de sangre periférica humana (huPBL) y mantener el injerto durante al menos 30 días (King et al., 2008). Este modelo de ratón, también conocido como modelo huPBL-NSG, se utilizó para evaluar el efecto funcional de la administración sistémica *in vivo* de los anticuerpos en las células inmunes humanas.

Específicamente, se transfirieron adoptivamente 6 millones de PBMC humanas recién aisladas mediante inyección intravenosa a ratones huPBL-NSG. Nueve días después de las inyecciones de PBMC, a los animales se les administró una única dosis de 1 mg/kg de monoanticuerpo, anticuerpo biespecífico o anticuerpo de control de isotipo mediante inyección intraperitoneal. En los días 24 a 28 después del injerto de PBMC, las PBMC se tiñeron con anticuerpos contra CD45 humano y murino evaluados mediante citometría de flujo. Se utilizaron perfiles de dispersión frontal y lateral para determinar un cuadrante de linfocitos. Los anticuerpos biespecíficos fueron capaces de potenciar la expansión de los leucocitos humanos como lo demuestra el aumento de la proporción de células CD45⁺ humanas en la sangre periférica de los ratones injertados. Para cada grupo, n $\geq$ 6 ratones.

Ejemplo 6 Inhibición del crecimiento de células tumorales PC-3 o A498 en huPBL-NSG mediante anticuerpo anti-PD-L1-ViD/elgG1

- 5 Se puede utilizar la línea celular de cáncer de próstata humana positiva para PD-L1, PC-3 (ATCC# CRL-1435) o la línea celular de cáncer de riñón, A498 (ATCC® HTB-44™) para establecer modelos de xenoinjerto en ratones huPBL-NSG. Para la formación de tumores, se inyectarán por vía subcutánea 3×10^6 células PC-3 (o células A498)/ratón en ratones huPBL-NSG como se describió anteriormente. Para evaluar los efectos inhibidores sobre el crecimiento del tumor, se administrarán por vía intravenosa diferentes concentraciones de anticuerpo anti-PD-L1-VID/elgG1, anticuerpo de referencia o anticuerpo isotipo de 0.1-3 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas en los ratones
10 después de 14 días de implantación de células tumorales. El crecimiento del tumor se medirá dos veces por semana hasta 5 semanas como se describe en el modelo de ratones Fox Chase SCID® Beige.

Ejemplo 7 Evaluación farmacocinética de anti-PD-L1-VID/elgG1 en ratones y monos

- 15 Se administrarán de 10 mg/kg a 40 mg/kg de proteínas bifuncionales, anti-PD-L1-VID/elgG1 en ratones o monos mediante inyección subcutánea o inyección intravenosa. Se tomarán muestras de suero en diferentes momentos después de la inyección hasta 15 días. Las concentraciones de la proteína de fusión Fc en las muestras de suero se determinarán mediante un ensayo ELISA tipo sándwich.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma que comprende al menos uno de cadena polipeptídica, en donde la cadena polipeptídica comprende:

un dominio de unión que se une a una proteína de la superficie celular, en el que el dominio de unión se une al ligando de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-L1), y el dominio de unión comprende:

un dominio variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden respectivamente una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

SEQ ID NO. 4 y el aminoácido 1-111 de la SEQ ID NO. 3; y
SEQ ID NO. 6 y el aminoácido 1-110 de la SEQ ID NO. 5; y

un dominio inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs. 1, 2, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y una combinación de las mismas.

2. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, en la que la cadena polipeptídica comprende, además:

un dominio Fc; y

un fragmento Fab conectado al extremo terminal N del dominio Fc, y el fragmento Fab que comprende el dominio de unión, en el que el dominio inhibidor de VEGF está conectado al extremo terminal C del dominio Fc.

3. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 2, que comprende además un conector entre el dominio Fc y el dominio inhibidor de VEGF.

4. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 3, en la que la proteína de fusión bifuncional comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 12 o 13.

5. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma comprende un par de cadenas polipeptídicas.

6. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 5, en la que la proteína de fusión bifuncional comprende un anticuerpo IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY.

7. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 6, en la que la proteína de fusión bifuncional comprende un anticuerpo IgG.

8. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 7, en la que el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

9. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 8, en la que el anticuerpo IgG1 es un anticuerpo IgG1 modificado elgG1 que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO. 8.

10. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión bifuncional comprende un anticuerpo humano.

11. Una composición farmacéutica, que comprende:

una proteína de fusión bifuncional o una porción de unión a antígeno de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende:

un agente terapéutico; y

una proteína de fusión bifuncional o una porción de unión a antígeno de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el agente terapéutico está conjugado covalentemente con la proteína de fusión bifuncional o la porción de unión al antígeno de la misma mediante un conector.

13. Una proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en el tratamiento del cáncer.

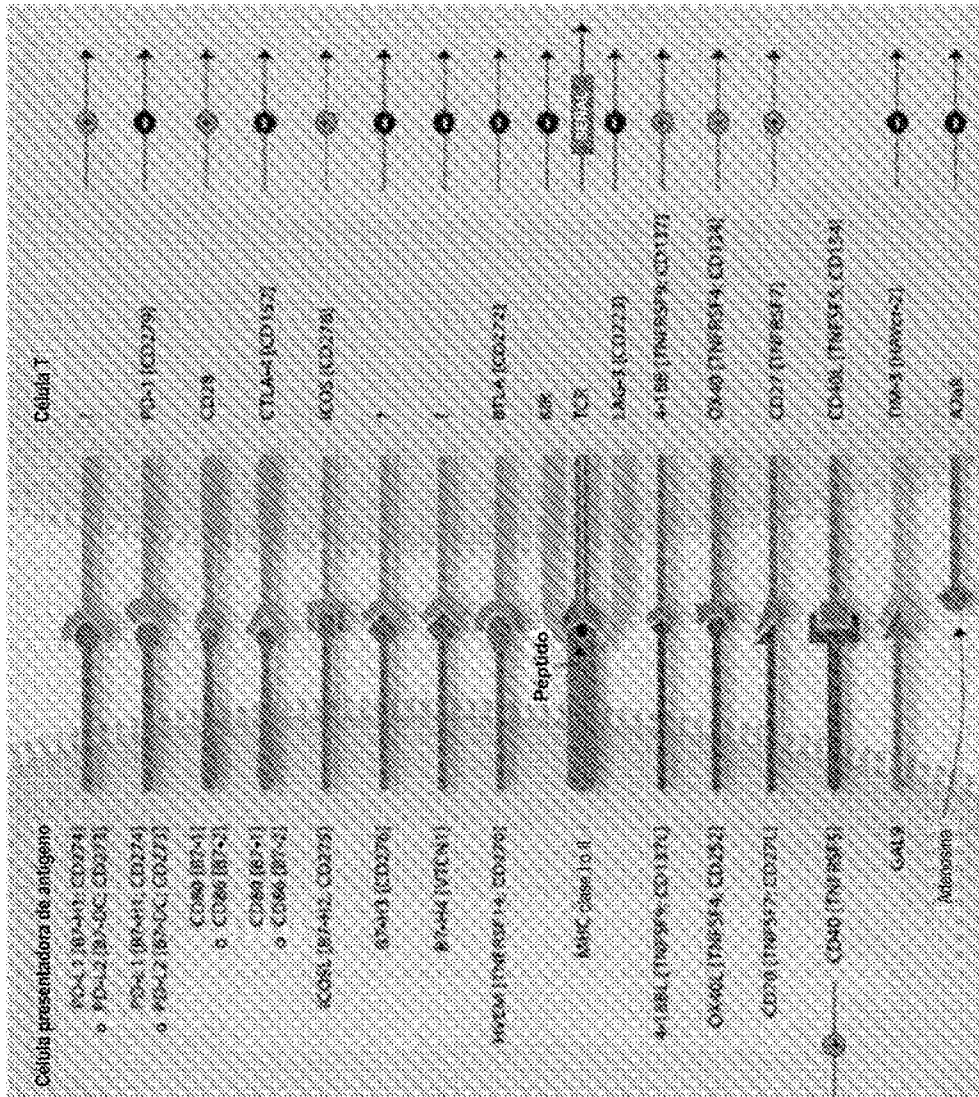
14. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), melanoma, linfoma, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células renales (RCC) y cáncer de ovario.

5

15. La proteína de fusión bifuncional o porción de unión a antígeno de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la cantidad eficaz es de 0.001 µg/kg a 250 mg/kg.

16. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión bifuncional o la porción de unión a antígeno de la misma de la reivindicación 1.

10



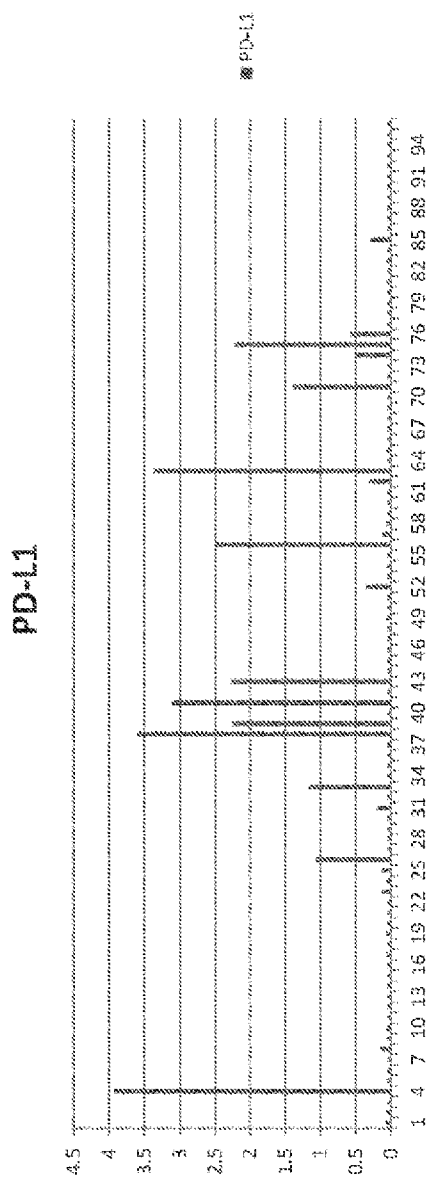


Fig. 2A

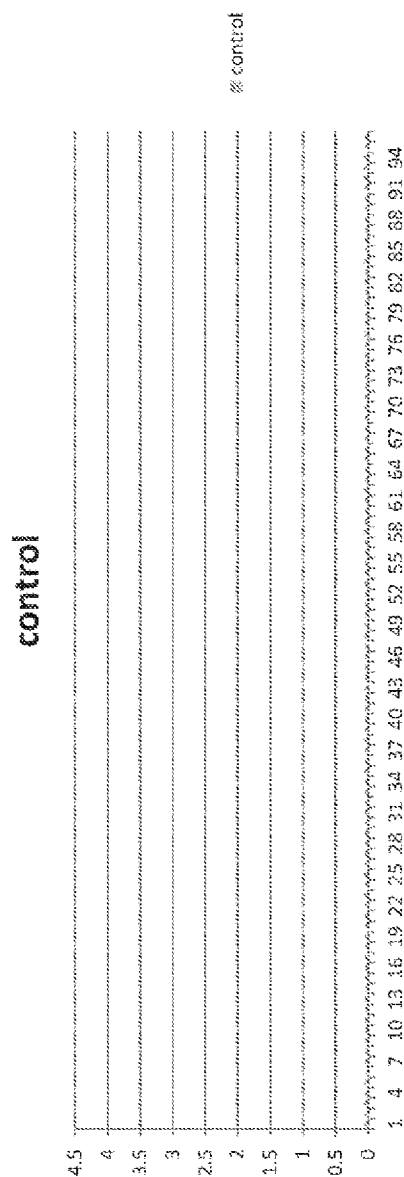


Fig. 2B

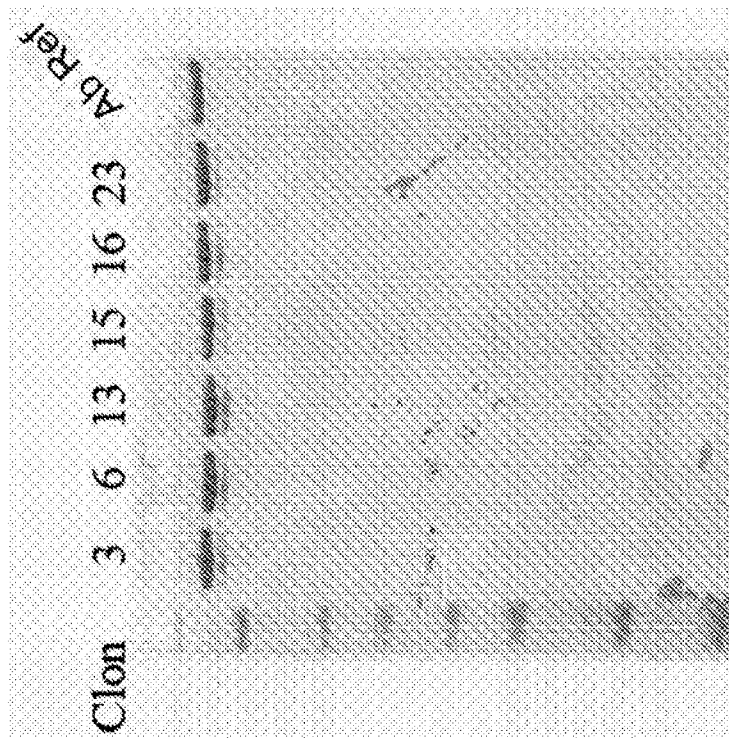


Fig. 3

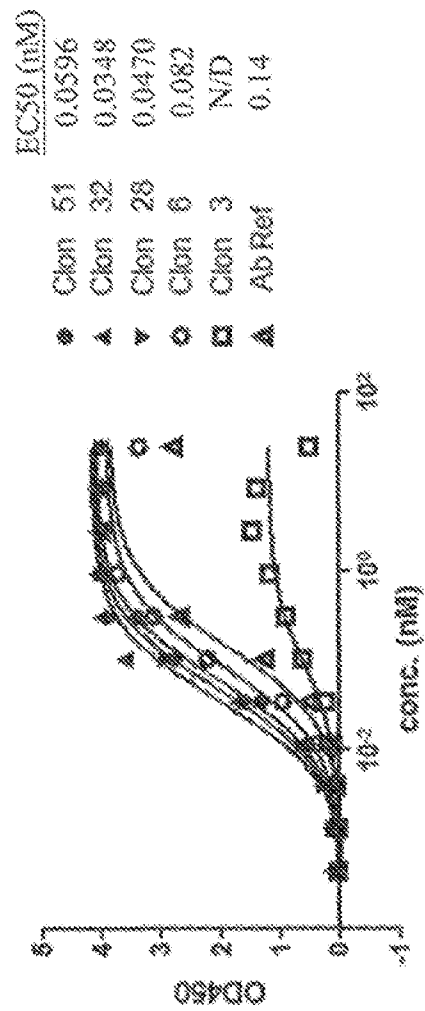


Fig. 4

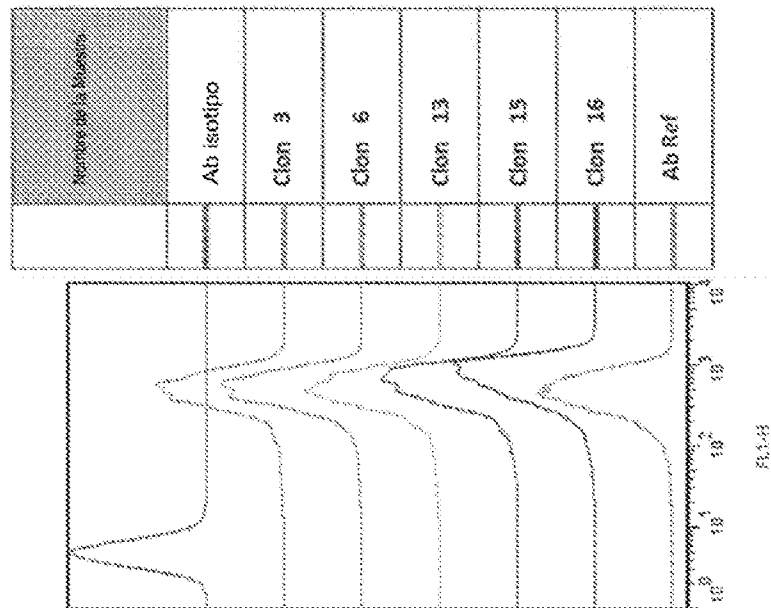


Fig. 5

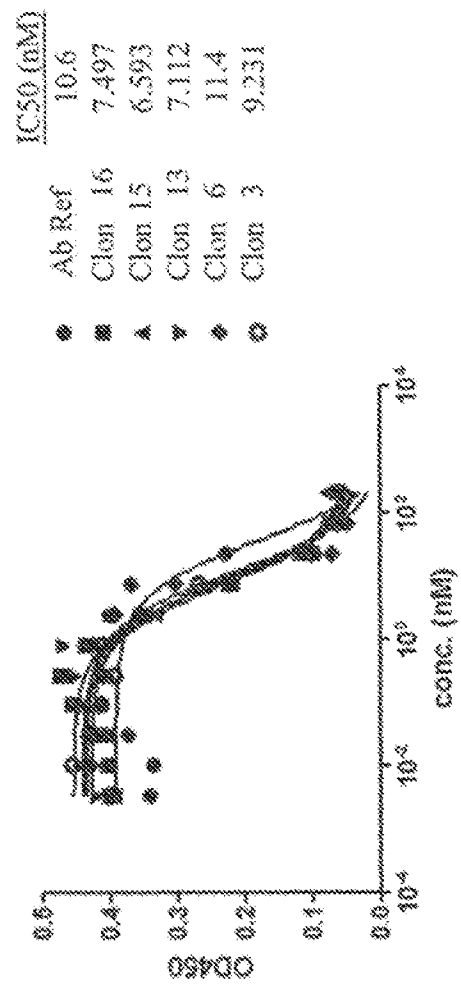
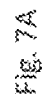
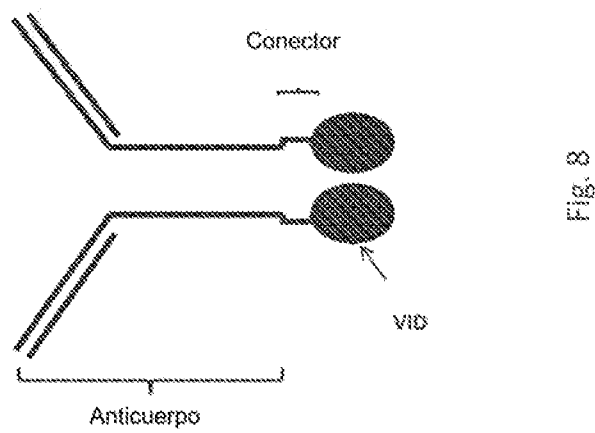


Fig. 6





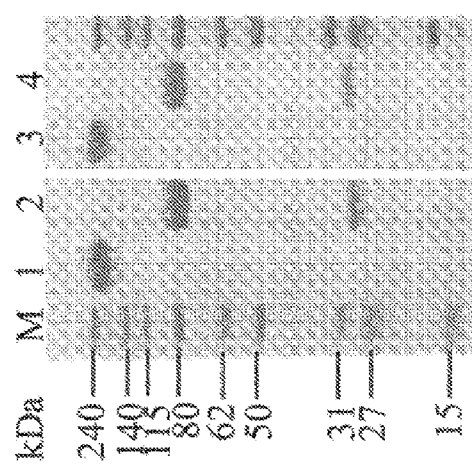
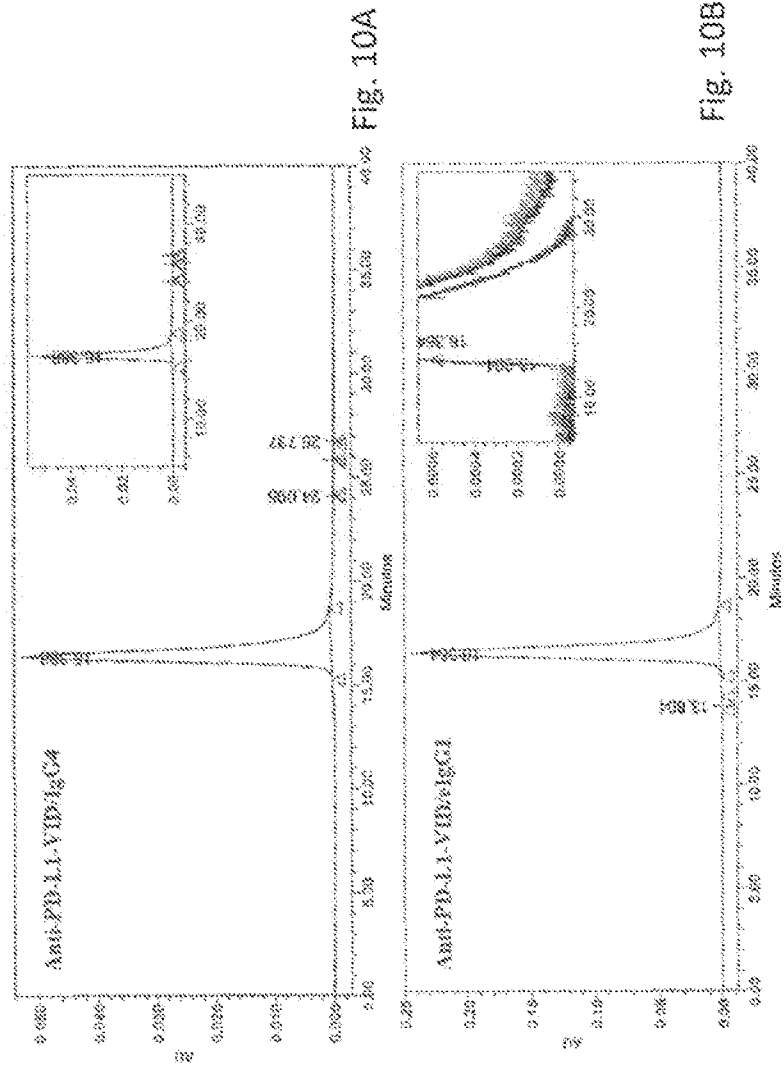
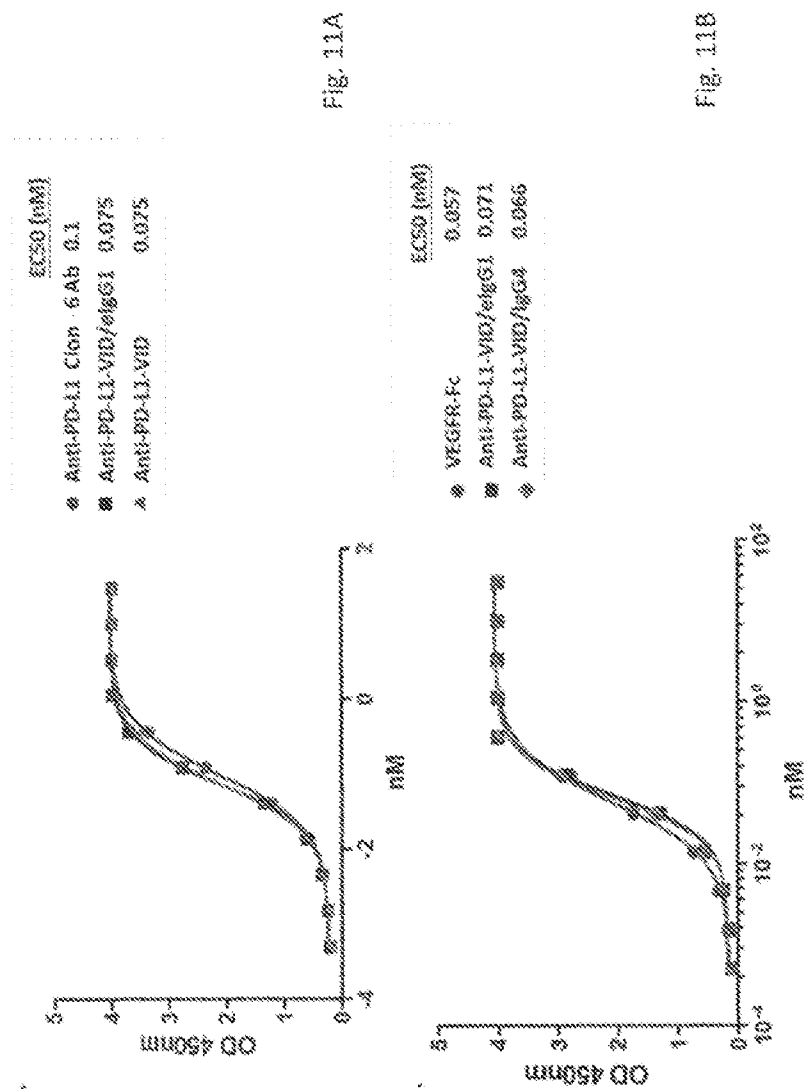


Fig. 9





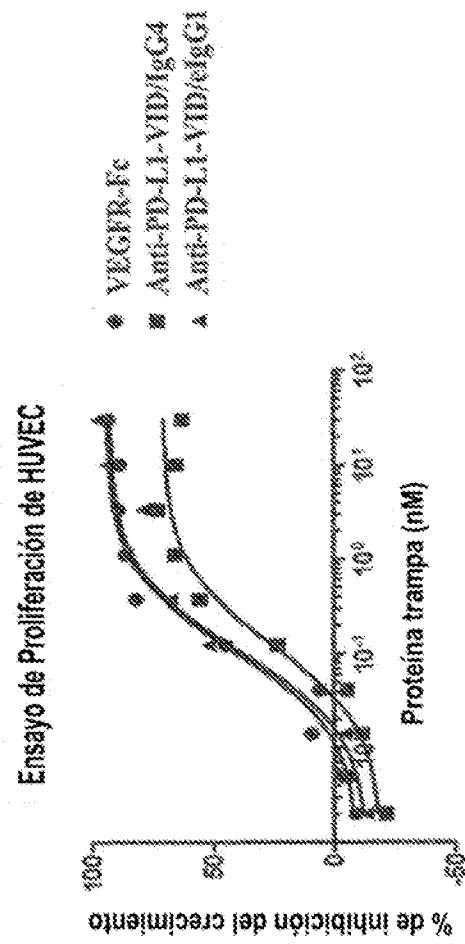


Fig. 12

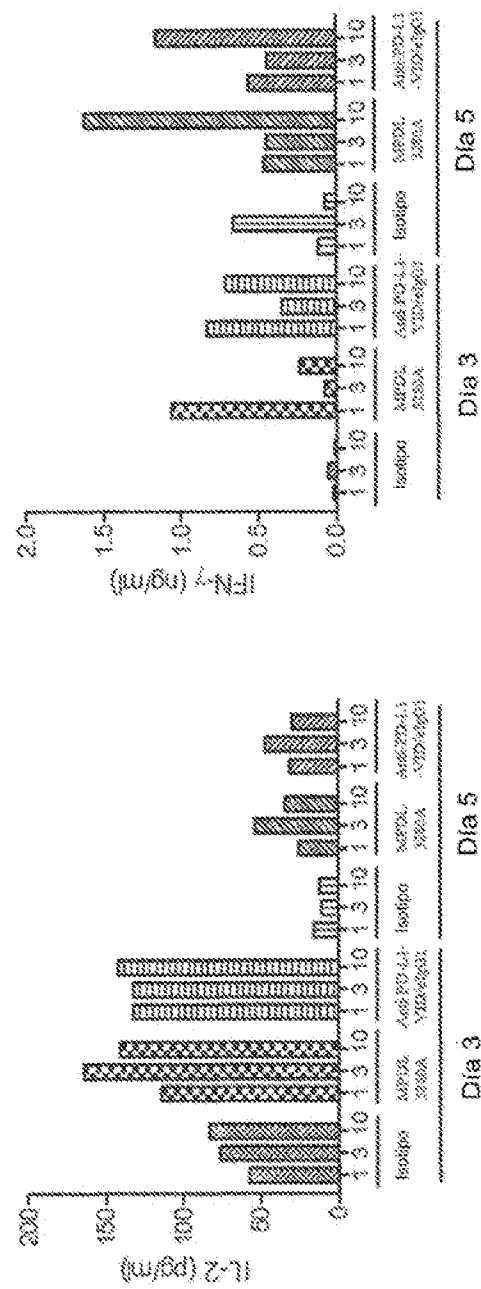


Fig. 13B

Fig. 13A

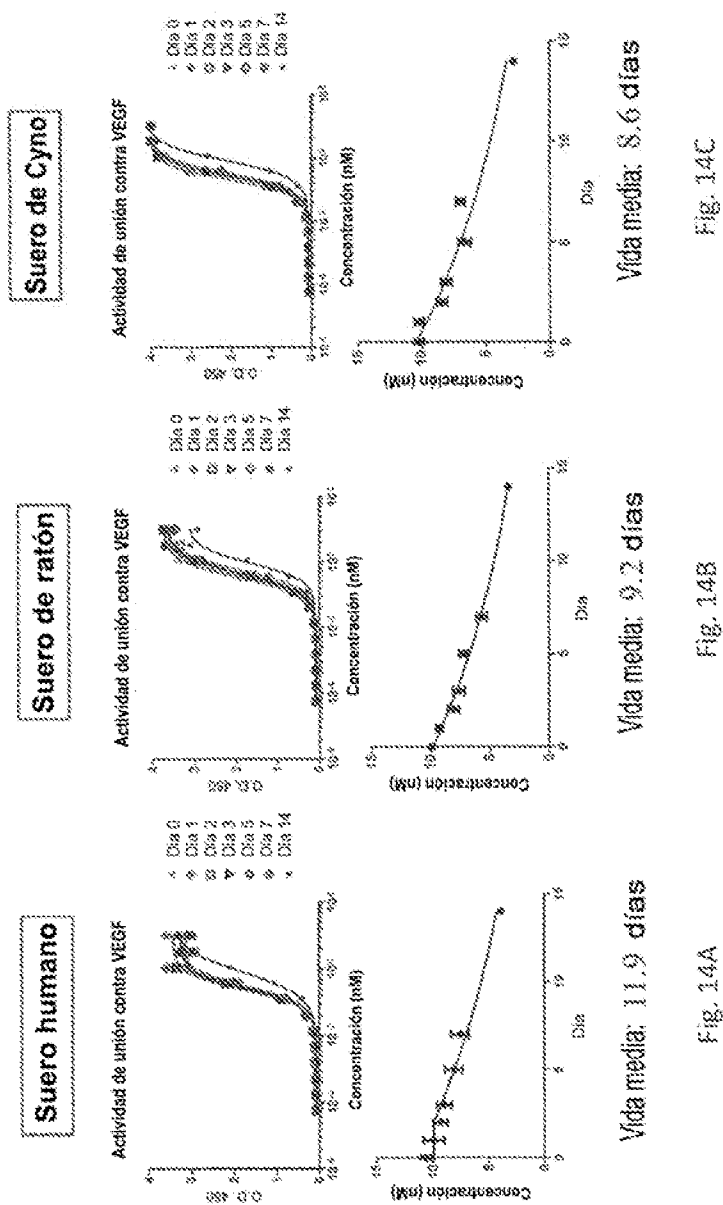


Fig. 14C

Fig. 14B

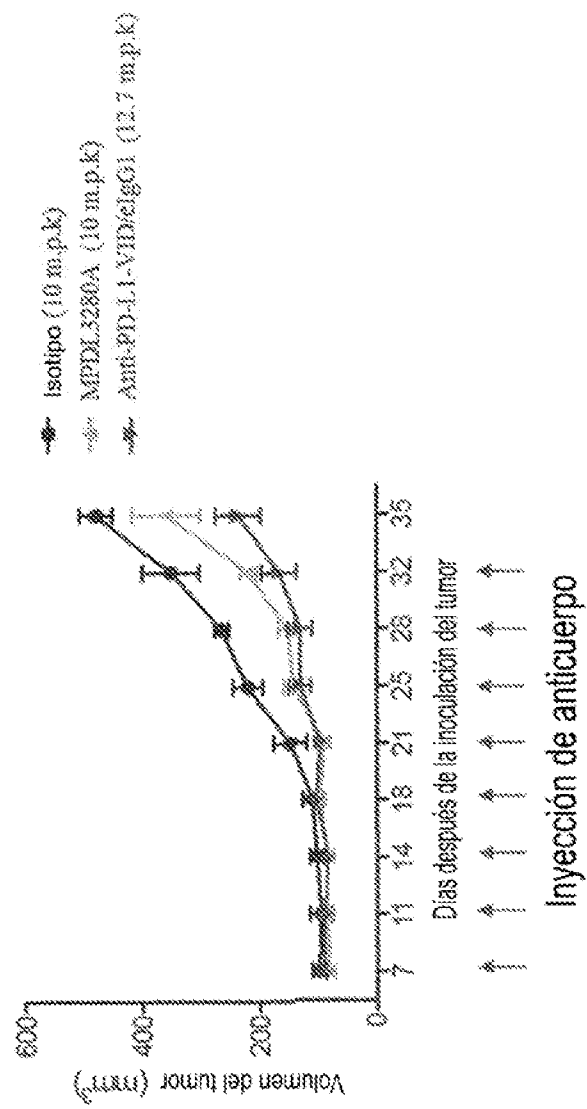


Fig. 15A

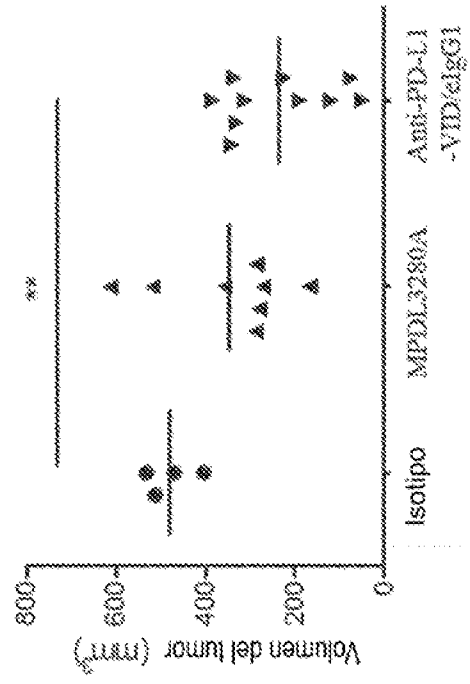


Fig. 15B

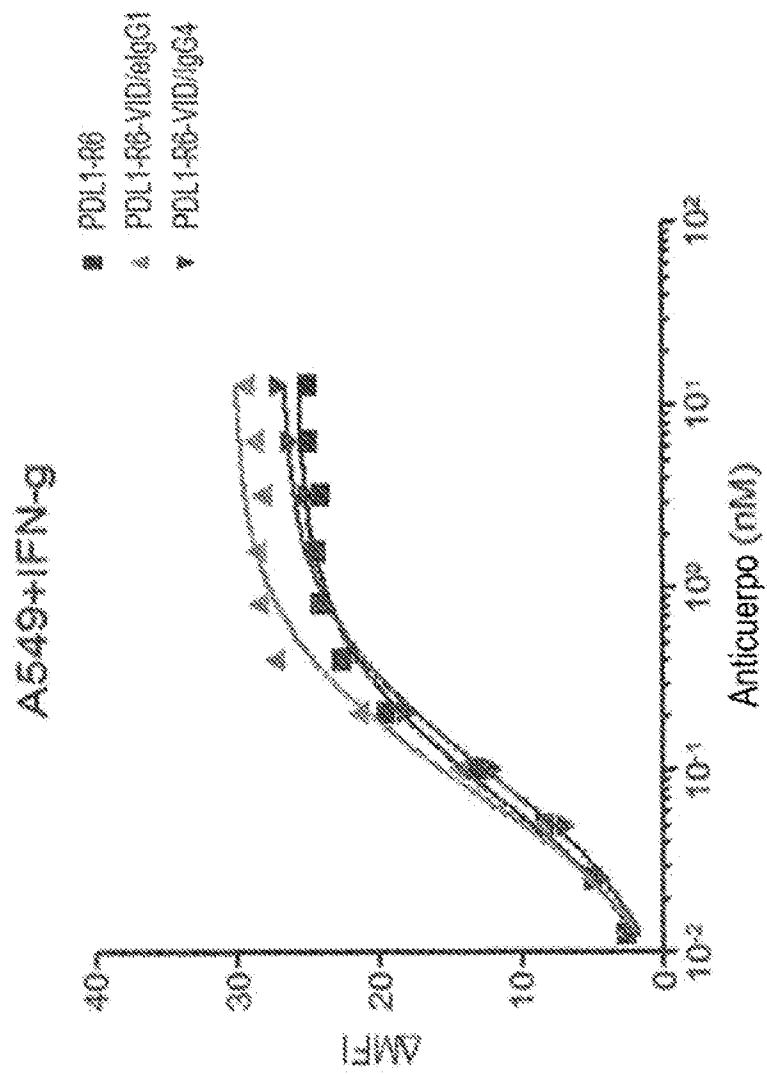


Fig. 16A

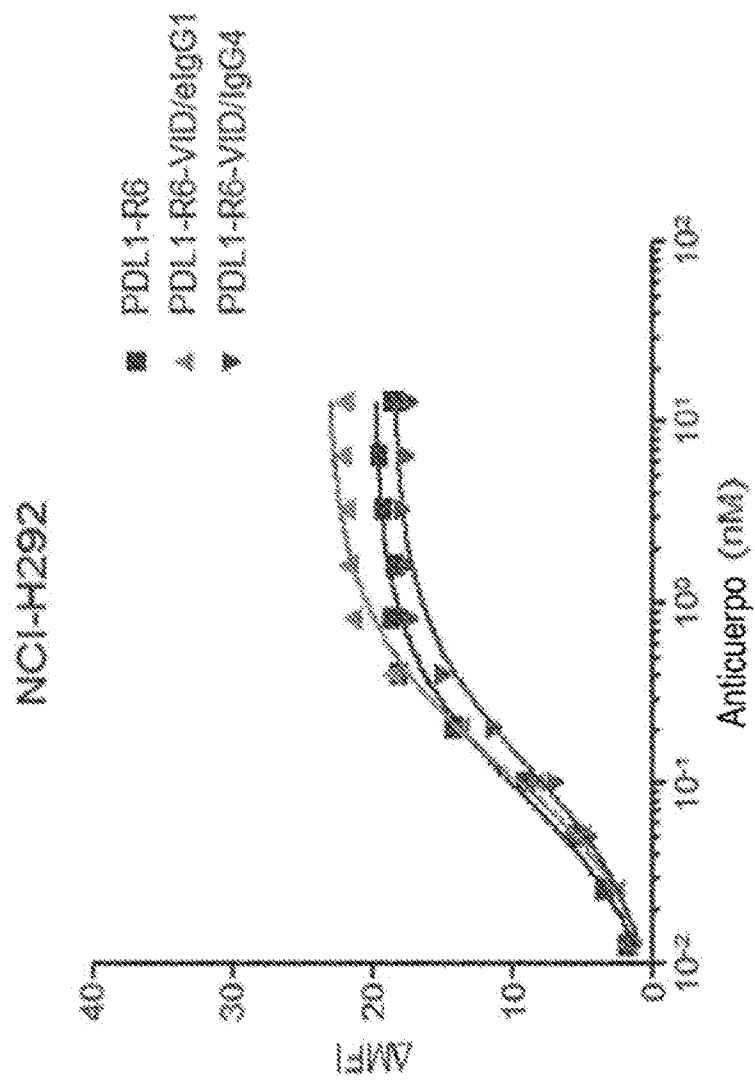


Fig. 16B

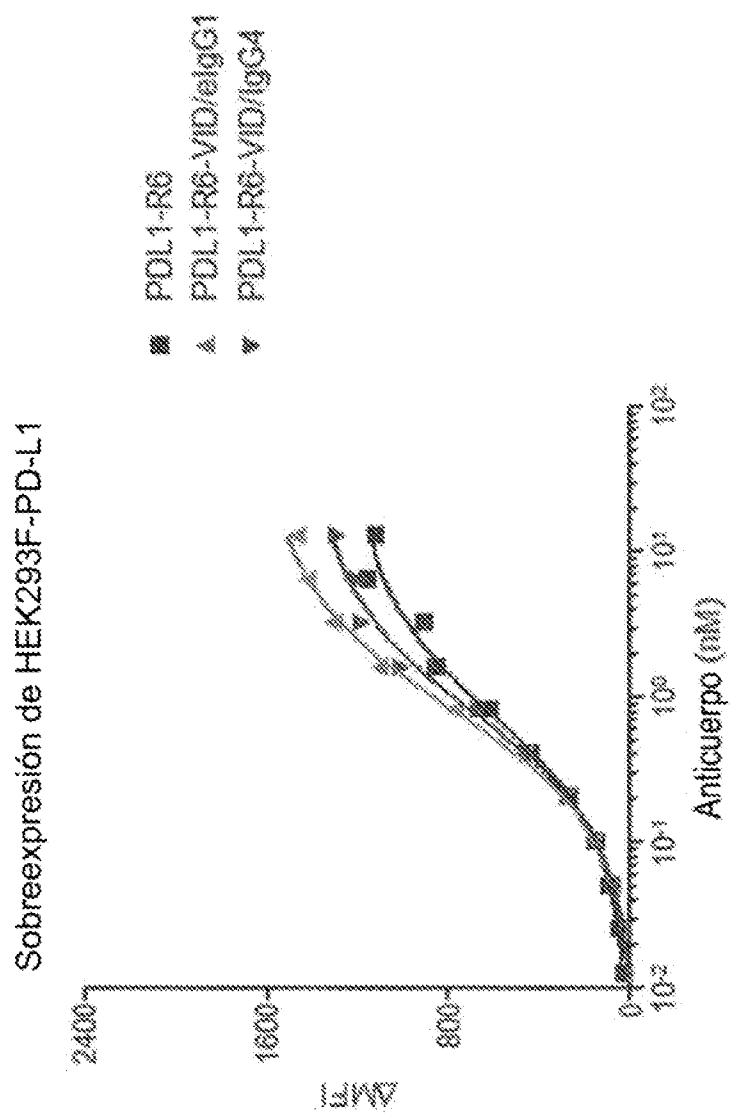


Fig. 16C