

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 025 557**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.07.2019 PCT/EP2019/068804**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020 WO20011973**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2019 E 19742154 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025 EP 3820899**

(54) Título: **Moléculas de anticuerpo**

(30) Prioridad:

12.07.2018 GB 201811403

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

09.06.2025

(73) Titular/es:

**INVOX PHARMA LIMITED (100.00%)
Suite 2, First Floor, The Westworks 195 Wood
Lane, White City Place
London W12 7FQ, GB**

(72) Inventor/es:

**WOLLERTON, FRANCISCA;
LAKINS, MATTHEW;
WYDRO, MATEUSZ;
SURADE, SACHIN y
DYSON, MICHAEL**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 025 557 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

Moléculas de anticuerpo

5 Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al ligando de muerte programada 1 (PD-L1). Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden encontrar aplicación, por ejemplo, en la terapia del cáncer.

Antecedentes de la invención

15 La muerte celular programada 1 (PD-1) es un receptor de la superficie celular, sus ligandos PD-L1 (CD274, B7-H1) y PD-L2 (B7-DC) suministran señales inhibidoras que regulan el equilibrio entre activación, tolerancia e inmunopatología de las células T. PD-L1 se expresa transitoriamente en todas las células inmunitarias y algunas células tumorales.

20 PD-L1 es una proteína transmembrana de tipo I con dos dominios similares a Ig dentro de la región extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto. La secuencia completa de PD-L1 humano (hPD-L1) se puede encontrar bajo el No. de Acceso Q9NZQ7 de GENBANK®. El dominio citoplasmático no tiene un resto de transducción de señal conocido sugiriendo que no hay señalización por PD-L1 en la interacción del ligando con su receptor. El peso molecular de PD-L1 es 40 kDa (290 aminoácidos), está codificado por el gen CD274 en el cromosoma 9 humano y en el cromosoma 19 de ratón. PD-L1 es un miembro de la familia de 25 proteínas B7 y comparte aproximadamente el 20 % de identidad de secuencia de aminoácidos con B7.1 y B7.2. PD-L1 humano comparte el 70 % y 93 % de identidad de aminoácidos con los ortólogos murinos y de cynomolgus de PD-L1, respectivamente.

30 PD-L1 humano se une a su receptor, PD-1, con una afinidad (KD) de 770 nM. PD-1 se expresa en células T activadas, células B y células mieloídes; modula la activación o inhibición de respuestas inmunitarias celulares. La unión de PD-L1 a PD-1 suministra una señal inhibidora, reduciendo la producción de citocinas y suprimiendo la proliferación de las células T. En consecuencia, la expresión de PD-L1 por las células puede mediar la protección contra la muerte de linfocitos T citotóxicos (CTL) y es un mecanismo regulador que amortigua las 35 respuestas inmunitarias crónicas durante las infecciones virales. El cáncer, como una enfermedad crónica y proinflamatoria, altera esta ruta inmunoprotectora a través de la regulación al alza de la expresión de PD-L1 para evadir la respuesta inmunitaria del huésped. En el contexto de una respuesta inmune activa, IFNγ también regula al alza la expresión de PD-L1. PD-L1 también media la supresión inmunitaria a través de la interacción con otra proteína, B7.1 (también conocida como CD80), bloqueando su capacidad para suministrar una de las 40 señales secundarias de activación en las células T a través de CD28. En términos de expresión de PD-L1 en células tumorales y su acoplamiento con B7.1, la relevancia de esta interacción específica en la resistencia inmunitaria tumoral todavía no está clara.

45 La expresión de PD-L1 se ha mostrado en una amplia variedad de tumores sólidos. De 654 muestras examinadas en un estudio, que abarcaban 19 tumores de diferentes sitios, 89 (14 %) fueron positivas para PD-L1 (≥ 5 % de frecuencia). Las frecuencias positivas para PD-L1 más altas se observaron en cáncer de cabeza y cuello (17/54; 31 %), de cuello uterino (10/34; 29 %), cáncer de origen primario desconocido (CUP; 8/29; 28 %), glioblastoma multiforme (GBM; 5/20; 25 %), vejiga (8/37; 21 %), esofágico (16/80; 20 %), mama triple negativo (TN) (6/33; 18 %) y hepatocarcinoma (6/41; 15 %) (Grosso et al., 2013). Se ha mostrado que la expresión asociada a tumor de PD-L1 confiere resistencia inmunitaria y protege potencialmente a las células tumorales de la apoptosis mediada por las células T.

50 Las terapias dirigidas a PD-L1 han mostrado excelentes resultados en estudios murinos *in vivo*. En el modelo murino B16 de melanoma, el tratamiento con terapia anti-PD-L1 combinada con estrategias de vacunación GVAX o FVAX dio como resultado un efecto significativo tanto sobre la supervivencia (30 días para el control frente a 52 días para el tratado con PD-L1) como sobre el porcentaje de animales sin tumor (5 %) tras la conclusión del estudio (Curran et al., 2010). La terapia anti-PD-L1 también se ha usado para estudiar el mecanismo de la supresión inmunitaria en el modelo de mastoma murino P815. Las células P815 inyectadas en ratones desencadenan normalmente una fuerte respuesta inmunitaria, que da como resultado su rechazo. Cuando PD-L1 se expresa en células P815, estas células escapan del ataque inmunitario, que a su vez puede negarse a través de la administración de anticuerpos anti-PD-L1 (Iwai et al., 2002). Es evidente que la toma como diana del eje PD-1/PD-L1 en cánceres humanos inmunogénicos (Herbst et al., 2014) da como resultado una ventaja de supervivencia a través de la estimulación de una respuesta inmunitaria anticancerosa (Wolchok et al., 2013; Larkin et al., 2015).

65 Atezolizumab (MPDL3280A, RG7466, TECENTRIQ™) es un anticuerpo IgG1 humanizado que se une a PD-L1. Se encuentra en ensayos clínicos como monoterapia y también en combinación con otras terapias biológicas

y/o de moléculas pequeñas para el tratamiento de cánceres sólidos, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer de mama, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de vejiga y carcinoma de células renales. El tratamiento con atezolizumab dio como resultado tasas de respuesta objetiva (ORR) del 23 % en NSCLC, del 36 % en melanoma, del 33 % en cáncer vejiga, del 14 % en RCC y del 13 % en cánceres de cabeza y cuello (Herbst et al., 2014; Powles et al., 2014).

En mayo de 2016, la FDA concedió la aprobación acelerada para atezolizumab para el tratamiento de carcinoma urotelial metastásico o avanzado localmente después del fracaso de la quimioterapia basada en cisplatino; sin embargo, el ensayo confirmatorio no logró conseguir su punto final primario de la supervivencia global. En octubre de 2016, la FDA aprobó atezolizumab para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) metastásico que tenían progresión de la enfermedad durante o después de la quimioterapia que contenía platino. Se requiere que los pacientes con aberraciones tumorales genómicas de EGFR o ALK tengan progresión de enfermedad en terapia aprobada por la FDA para estas aberraciones antes de recibir atezolizumab. Atezolizumab en combinación con avastina y quimioterapia estándar para algunos pacientes con cáncer de pulmón está bajo la revisión prioritaria de la FDA, esperándose una decisión el 5 de septiembre de 2018. Los efectos adversos más comunes notificados en estudios clínicos de atezolizumab fueron fatiga, apetito disminuido, náuseas e infecciones; la infección del tracto urinario fue el efecto adverso grave más común.

Avelumab (MSB0010718C, BAVENCIO™) es un anticuerpo IgG1 completamente humano que se une a PD-L1 y está sometiéndose a ensayos clínicos en varios cánceres, incluyendo cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer renal y carcinoma de células de Merkel. Avelumab recibió la designación de fármaco huérfano por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para el tratamiento del cáncer gástrico en enero de 2017. En 2017, la FDA y la EMA aprobaron avelumab para carcinoma de células de Merkel (un cáncer agresivo de piel) en adultos y pacientes pediátricos de 12 años y más. La aprobación se basó en datos de un ensayo clínico multicéntrico, de brazo único, abierto (ensayo JAVELIN Merkel 200). Todos los pacientes tenían MCC metastásico confirmado histológicamente con progresión de la enfermedad durante o después de quimioterapia administrada para enfermedad metastásica. La tasa de respuesta global (ORR) se evaluó por un comité de revisión independiente según los Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) 1.1. La ORR fue del 33 % (intervalo de confianza del 95 % [IC]: 23,3, 43,8), con un 11 % de tasas de respuesta completa y un 22 % de parcial. Entre los 29 pacientes respondedores, la duración de la respuesta varió de 2,8 a 23,3+ meses, durando el 86 % de las respuestas durante 6 meses o más. Se observaron respuestas en pacientes independientemente de la expresión tumoral de PD-L1 o la presencia de poliomavirus de células de Merkel. Los datos de seguridad se evaluaron en 1.738 pacientes. Las reacciones adversas graves más comunes al avelumab fueron reacciones adversas mediadas por el sistema inmunitario (neumonitis, hepatitis, colitis, insuficiencia suprarrenal, hipo e hipertiroidismo, diabetes mellitus y nefritis) y reacciones a la infusión potencialmente mortales. Entre los 88 pacientes incluidos en el ensayo JAVELINA Merkel 200, las reacciones adversas más comunes fueron fatiga, dolor musculoesquelético, diarrea, náuseas, reacción relacionada con la infusión, erupción, disminución del apetito y edema periférico. Las reacciones adversas graves que se produjeron en más de un paciente en el ensayo fueron lesión renal aguda, anemia, dolor abdominal, íleo, astenia y celulitis.

Durvalumab (MEDI4736, IMFINZI™) es un anticuerpo IgG1 humano que se une a PD-L1 y que se está ensayando en ensayos clínicos solo o en combinación con tremelimumab en cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer pancreático y con otras moléculas biológicas y pequeñas en ensayos para cánceres sólidos adicionales tales como cánceres gástricos, melanoma y carcinoma hepatocelular no resecable.

Durvalumab fue aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con carcinoma urotelial metastásico o avanzado localmente que tienen progresión de la enfermedad durante o después de la quimioterapia que contiene platino o tienen progresión de la enfermedad dentro de los 12 meses de tratamiento neoadyuvante o adyuvante con quimioterapia que contiene platino.

Un ensayo clínico de fase 1B de durvalumab y tremelimumab mostró alguna actividad en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Sin embargo, en julio de 2017, AstraZeneca anunciaba que un ensayo de fase III de durvalumab con tremelimumab como tratamiento de primera línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas no había conseguido cumplir su punto final primario de supervivencia libre de progresión.

Se informó que los resultados tempranos de un ensayo de fase I que combinaba durvalumab y gefitinib en pacientes con cáncer de pulmón "fueron prometedores". Está en curso un ensayo clínico de fase 1 usando durvalumab con un agonista de TLR 7/8 (MEDI 9197) para tumores sólidos. Está en curso un ensayo de Fase 1b/2a combinando durvalumab con una vacuna de ADN de HPV (MEDI 0457) en pacientes con cáncer de cabeza y cuello metastásico/recurrente asociado con HPV.

En noviembre de 2017, el ensayo clínico doble ciego de fase 3 PACIFIC de AstraZeneca informó de la eficacia

de durvalumab en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio III. Se asignó aleatoriamente una cohorte de 709 pacientes con NSCLC en estadio III, que no tenían progresión de la enfermedad después de dos o más ciclos de una quimioterapia basada en platino, para recibir durvalumab o un placebo como terapia de consolidación para su cáncer de pulmón. Durvalumab aumentó la mediana de la supervivencia libre de progresión de 5,6 meses (placebo) a 16,8 meses (durvalumab); la tasa de supervivencia libre de progresión a los 12 meses aumentó del 35,3 % (placebo) al 55,9 % (durvalumab), y la tasa de supervivencia libre de progresión a los 18 meses aumentó del 27,0 % (placebo) al 44,2 % (durvalumab). La mediana del tiempo hasta la muerte o metástasis distantes aumentó de 14,6 meses (placebo) a 23,2 meses (durvalumab). Sin embargo, los efectos secundarios extremos también aumentaron del 26,1 % de los pacientes (placebo) al 29,9 % de los pacientes (durvalumab).

Se notificaron efectos adversos tras la exposición a durvalumab en 182 pacientes con carcinoma urotelial metastásico o localmente avanzado cuya enfermedad ha progresado durante o después de un régimen estándar basado en platino. Los pacientes recibieron 10 mg/kg de durvalumab mediante infusión intravenosa cada 2 semanas. La mediana de la duración de la exposición fue de 10,2 semanas (rango: 0,14, 52,4). El treinta y uno por ciento (31 %) de los pacientes tuvieron un retraso o interrupción del fármaco por una reacción adversa. Las más comunes (> 2 %) fueron lesión hepática (4,9 %), infección del tracto urinario (3,3 %), lesión renal aguda (3,3 %) y dolor musculoesquelético (2,7 %). Las reacciones adversas más comunes (\geq 15 %) fueron fatiga (39 %), dolor musculoesquelético (24 %), estreñimiento (21 %), apetito disminuido (19 %), náuseas (16 %), edema periférico (15 %) e infección del tracto urinario (15 %). Las reacciones adversas de Grado 3 o 4 más comunes (\geq 3 %) fueron fatiga, infección del tracto urinario, dolor musculoesquelético, dolor abdominal, deshidratación y deterioro general de la salud física. Ocho pacientes (4,4 %) que fueron tratados con durvalumab experimentaron eventos adversos de Grado 5 de parada cardiorrespiratoria, deterioro general de la salud física, sepsis, íleo, neumonitis o hepatitis mediada por el sistema inmune. Tres pacientes adicionales estaban experimentando infección y progresión de la enfermedad en el momento de la muerte. Se interrumpió durvalumab por reacciones adversas en el 3,3 % de los pacientes. Se produjeron reacciones graves en el 46 % de los pacientes. Las reacciones adversas graves más frecuentes (> 2 %) fueron lesión renal aguda (4,9 %), infección del tracto urinario (4,4 %), dolor musculoesquelético (4,4 %), lesión hepática (3,3 %), deterioro general de la salud física (3,3 %), sepsis, dolor abdominal, pirexia/fiebre asociada a tumor (2,7 % cada uno).

Las reacciones adversas mediadas por el sistema inmunitario que requirieron corticoesteroides sistémicos o terapia de sustitución hormonal se produjeron en el 8,2 % de los pacientes (15/182), incluyendo el 5,5 % de los pacientes (10/182) que requirieron terapia sistémica con corticoesteroides y el 2,7 % de los pacientes (5/182) que sólo requirieron terapia de sustitución hormonal. Siete pacientes (3,8 %) recibieron una dosis oral de prednisona equivalente a > 40 mg al día para una reacción adversa mediada por el sistema inmunitario.

Se han probado otros anticuerpos anti-PD-L1 incluyendo BMS-936559 en ensayos clínicos, y otros están en pruebas preclínicas.

WO2013181634 (Sorrento Therapeutics) describe anticuerpos anti-PD-L1. Solo se dice que un anticuerpo divulgado, "SH1E2" (SEQ ID NO: 147/148 en esa solicitud), muestra una activación mejorada de las células T, medida por el porcentaje de células positivas para CD25, en comparación con los anticuerpos 10A5 y YW234.55S70 de PD-L1 divulgados en la técnica.

WO2017220990 (Kymab Limited) describe anticuerpos anti-PD-L1 y el uso de los mismos.

Schlothauer *et al.* (2016) describe dominios Fc de anticuerpos diseñados por ingeniería que tienen suprimidas las interacciones FcγR y C1q.

Lobner *et al.* (2017) describe dominios Fc de anticuerpos diseñados por ingeniería para comprender sitios de unión a antígeno de VEGF en los bucles estructurales del dominio CH3.

Callahan *et al.* (2016) es un artículo de revisión que describe anticuerpos que bloquean el punto de control, incluyendo anticuerpos anti-PD-L1, y su desarrollo clínico.

Chatterjee *et al.* (2017) describe el uso del anticuerpo anti-PD-L1 atezolizumab radiomarcado para detectar PD-L1 en un método de imagenología no invasiva.

Las enfermedades infecciosas muestran muchos paralelismos con la oncología. Se cree que el papel de PD-L1 en la regulación inmunitaria podría aprovecharse para maximizar la respuesta inmunitaria contra patógenos. La inmunomodulación en enfermedades infecciosas es un área emergente de la medicina y las revisiones tempranas sugieren que el bloqueo de PD-L1 puede mejorar las respuestas biológicas a la infección, en particular, ayudando a contrarrestar el agotamiento de las células T, gestionando la eliminación mediada por el sistema inmunitario y generando inmunidad a largo plazo (Wykes y Lewin, 2017). Por tanto, también sigue existiendo la necesidad en la técnica de moléculas adicionales que puedan dirigirse a PD-L1 y que encuentren aplicación en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Los anticuerpos que se dirigen a PD-L1 también pueden ser útiles para tratar afecciones asociadas con

inflamación, tales como inflamación vascular y accidente cerebrovascular.

Aunque hay varios agentes terapéuticos anti-PD-L1 en desarrollo, los datos actuales muestran que el tratamiento global con monoterapias anti-PD-L1 existentes da como resultado una respuesta en menos del 50 % de los pacientes con cáncer. El espectro y la gravedad de las reacciones adversas notificadas difieren entre los anticuerpos en los ensayos clínicos. Para aumentar la tasa de respuesta objetiva (ORR) y/o buscar reducir los efectos adversos, los anticuerpos anti-PD-L1 pueden combinarse con otros productos biológicos, tales como anticuerpos contra otros reguladores de puntos de control, así como con terapias de moléculas pequeñas y otros enfoques de activación del sistema inmunitario, tales como vacunas tumorales.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de moléculas adicionales que puedan dirigirse a PD-L1 y que encuentren aplicación en la terapia del cáncer.

Declaraciones de la invención

Los presentes inventores han preparado anticuerpos anti-PD-L1 mediante cribado de una biblioteca de fagos, seguido de mutagénesis, cribado, selección y transposición de cadenas ligeras para aislar anticuerpos anti-PD-L1 con afinidad por PD-L1 y actividad en un ensayo de activación de células T.

Se realizaron rondas adicionales de mutagénesis, cribado y selección para eliminar sitios potenciales para modificaciones postraduccionales y para mejorar las propiedades biofísicas de los anticuerpos seleccionados.

El enfoque anterior permitió la identificación de anticuerpos anti-PD-L1 que mostraron una excelente unión a PD-L1 y actividad en ensayos de activación de células T. Sobre la base de estas características, se espera que los anticuerpos de la invención encuentren aplicación en el tratamiento de cánceres humanos, así como enfermedades infecciosas e inflamatorias, a través de la inhibición de PD-L1.

También se mostró que los anticuerpos de la invención tienen una alta afinidad por PD-L1 de cynomolgus, comparable a su afinidad por PD-L1 humano. Los anticuerpos de la invención también mostraron afinidad mensurable por PD-L1 de ratón.

Además, se identificaron anticuerpos contra PD-L1 que tenían una temperatura de fusión relativamente alta, de los que puede esperarse que tengan una estabilidad potenciada, beneficiosa en la fabricación y almacenamiento de los anticuerpos.

La invención es como se expone en las reivindicaciones. Específicamente, la invención proporciona:

1. Una molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma capaz de unirse específicamente a PD-L1, que comprende un sitio de unión a antígeno que comprende el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo G1AA/E12v2 de las SEQ ID NO: 27 y 28, respectivamente.

2. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según la cláusula 1, en donde la molécula de anticuerpo comprende la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo G1AA/E12v2 de las SEQ ID NO: 47 y 48, respectivamente.

3. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma, según la cláusula 1 o 2, en donde:

(i) la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, es una molécula multiespecífica, preferiblemente biespecífica, que comprende al menos un segundo sitio de unión a antígeno;

(ii) la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma, comprende un segundo sitio de unión a antígeno localizado en un dominio constante de la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno; y/o

(iii) el segundo sitio de unión a antígeno comprende:

(a) una primera secuencia en el bucle estructural AB y/o una segunda secuencia en el bucle estructural EF de un dominio pesado constante,

(b) una primera secuencia en el bucle estructural AB y una segunda secuencia en el bucle estructural EF de un dominio pesado constante,

(c) una primera secuencia en el bucle estructural AB y/o una segunda secuencia en el bucle estructural EF y/o una tercera secuencia en el bucle estructural CD de un dominio pesado constante, o

(d) una primera secuencia en el bucle estructural AB, una segunda secuencia en el bucle estructural EF

- 5 y una tercera secuencia en el bucle estructural CD de un dominio pesado constante; opcionalmente, en donde el dominio constante de la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma definido en (ii) o el dominio pesado constante de la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma definido en (iii) es un dominio CH3.
- 10 4. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma, según cualquier cláusula anterior, en donde la molécula de anticuerpo es una inmunoglobulina G (IgG), o fragmento de unión a antígeno de la misma, opcionalmente en donde:
- 15 (i) la molécula de anticuerpo es una IgG1 o fragmento de la misma, o una IgG4 o fragmento de la misma; y/o
 (ii) la molécula de anticuerpo es una IgG1 o fragmento de la misma con una región Fc modificada; opcionalmente, además, en donde:
- 20 (a) la molécula de anticuerpo es una IgG1 o fragmento de la misma con una región Fc modificada con función efectora inmune reducida;
- 25 (b) el Fc modificado tiene ADCC y/o CDC reducida con respecto a IgG1;
 (c) la región Fc modificada comprende una modificación LALA, LALA-PA o LALA-PG; y/o
 (d) la molécula de anticuerpo es una IgG1 o fragmento de unión a antígeno de la misma que comprende una modificación LALA en la región Fc.
- 30 5. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma, según la cláusula 3 o 4, en donde:
- 35 (a) el segundo sitio de unión a antígeno se une a una molécula inhibidora de punto de control, molécula coestimuladora o antígeno asociado a tumor; y/o
 (b)
 (i) el segundo sitio de unión a antígeno no se une a OX40, coestimulador inducible de células T (ICOS) o CD137;
 (ii) el segundo sitio de unión a antígeno no se une a CD27 o proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR); o
 40 (iii) el segundo sitio de unión al antígeno no se une al gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3).
- 45 6. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según cualquier cláusula anterior, en donde la cadena pesada comprende además un resto de lisina adicional (K) en el extremo C de la secuencia del dominio CH3 de la cadena pesada.
- 50 7. Un conjugado o fusión que comprende la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según cualquier cláusula anterior y un modulador del sistema inmunitario (agonista o antagonista), una molécula citotóxica o un radioisótopo.
- 55 8. Una molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico que codifican la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las cláusulas 1 a 6, o el conjugado o fusión según la cláusula 7 que comprende la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las cláusulas 1 a 6 y un modulador del sistema inmunitario o una molécula citotóxica.
- 60 9. Una molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico según la cláusula 8, en donde la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico comprende una secuencia de ADNc que codifica una o más de los VH y VL; Fab; cadena pesada y/o ligera del anticuerpo G1AA/E12v2.
- 65 10. La molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico según la cláusula 9, en donde la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ADNc de VH que codifica el VH del anticuerpo G1AA/E12v2 de la SEQ ID NO: 27 y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ADNc de VL que codifica el VL del anticuerpo G1AA/E12v2 de la SEQ ID NO: 28.

11. Un vector o conjunto de vectores que comprende la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico de una cualquiera de las cláusulas 8 a 10.
- 5 12. Una célula huésped recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico de una cualquiera de las cláusulas 8 a 10, o el vector o conjunto de vectores de la cláusula 11.
- 10 13. Un método para producir la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de la misma, conjugado o fusión según cualquier cláusula anterior, que comprende cultivar la célula huésped recombinante de la cláusula 12 en condiciones adecuadas para la producción de la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado o fusión;
- opcionalmente, que comprende además aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado o fusión.
- 15 14. Una composición, por ejemplo, composición farmacéutica, que comprende la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado o fusión según cualquiera de las cláusulas 1 a 7 y un excipiente, por ejemplo, excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 15. La molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado o fusión según cualquiera de las cláusulas 1 a 7, o la composición según la cláusula 14, para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia; opcionalmente, en donde el método comprende administrar la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de la misma, conjugado, fusión o composición al cuerpo humano o animal en combinación con un segundo agente terapéutico, opcionalmente, en donde el segundo agente terapéutico es una radioterapia, preferiblemente radioterapia dirigida.
- 25 16. Un método *in vitro* para detectar o diagnosticar una enfermedad o trastorno en un individuo, comprendiendo el método el uso de la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado o fusión según cualquiera de las cláusulas 1 a 7, o la composición según la cláusula 14, en donde el método se practica en una muestra obtenida del individuo.
- 30 17. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquier cláusula anterior, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una afinidad (KD) por PD-L1 humano recombinante y por PD-L1 de cynomolgus recombinante de menos de 2 nM, preferiblemente menos de 1 nM, más preferiblemente menos de 0,75 nM, aún más preferiblemente menos de 0,5 nM cuando se mide por SPR (por ejemplo, Biacore).
- 35 18. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, según cualquier cláusula anterior, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, potencia la activación de las células T cuando se evalúa en un ensayo de Reacción Mixta de Linfocitos (MLR).
- 40 El tratamiento contra diversos tipos de cáncer usando anticuerpos anti-PD-L1 o anti-PD-1 se ha investigado en ensayos clínicos y ha mostrado resultados prometedores. Estos incluyen tumores sólidos tales como cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, fibrosarcoma, carcinoma de células renales, melanoma (melanoma avanzado y metastásico), cáncer pancreático, cáncer de mama, glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer de cabeza y cuello (tal como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), cáncer de estómago (cáncer gástrico), cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino (cáncer de endometrio uterino, cáncer de cuello uterino), cáncer vulvar, cáncer testicular, cáncer de pene, cáncer esofágico, carcinoma hepatocelular, cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer colorrectal deficiente en reparación de apareamiento erróneo de ADN, cáncer endometrial deficiente en reparación de apareamiento erróneo de ADN, cáncer de tiroides, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (tal como linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma indolente no de Hodgkin, linfoma de células del manto), leucemia (tal como leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide, leucemia linfoblástica aguda, o leucemia linfoblástica crónica), mieloma múltiple, y linfoma de células T periféricas. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede encontrar aplicación por tanto en el tratamiento de estos cánceres. Se sabe, o se espera, que los tumores de estos cánceres contengan células inmunitarias, tales como TIL, que expresan PD-L1.
- 45 En particular, el tratamiento de melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello (tal como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), mesotelioma, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de ovario, carcinoma de células Merkel, cáncer pancreático, melanoma y carcinoma hepatocelular usando anticuerpos anti-PD-L1 se ha investigado en ensayos clínicos y ha mostrado resultados prometedores. Por tanto, el cáncer que va a tratarse usando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede ser un melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, cáncer de vejiga, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello (tal como carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), mesotelioma, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no
- 50
- 55
- 60
- 65

pequeñas), cáncer de ovario, carcinoma de células de Merkel, cáncer pancreático, melanoma o carcinoma hepatocelular.

- 5 El cáncer puede caracterizarse por la proliferación anormal de células cancerosas malignas. Cuando la solicitud se refiere a un tipo particular de cáncer, tal como cáncer de mama, se refiere a una transformación maligna del tejido relevante, en este caso un tejido de mama. Un cáncer que se origina a partir de la transformación maligna de un tejido diferente, por ejemplo, tejido ovárico, puede dar como resultado lesiones metastásicas en otra ubicación en el cuerpo, tal como la mama, pero no es por ello un cáncer de mama como se denomina en la presente memoria sino un cáncer ovárico.
- 10 10 El cáncer puede ser un cáncer primario o secundario. Por tanto, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede ser para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente, en donde el cáncer es un tumor primario y/o una metástasis tumoral.
- 15 15 También se puede esperar que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención encuentre aplicación en el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como infecciones virales, bacterianas, fúngicas y/o parasitarias. Preferiblemente, la enfermedad infecciosa es una enfermedad viral, bacteriana o fúngica, más preferiblemente una enfermedad viral o bacteriana, lo más preferiblemente una enfermedad viral. La enfermedad infecciosa puede ser crónica o aguda, pero es preferiblemente crónica.
- 20 20 Los ejemplos de enfermedades virales que pueden tratarse con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención incluyen: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la gripe, enterovirus, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis D (VHD) y virus de la hepatitis E (VHE), virus sincitial respiratorio (VSR), herpesvirus (tales como virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple 1 (VHS-1), virus del herpes simple 2 (VHS-2), citomegalovirus (CMV)) e infección por papilomavirus.
- 25 25 Los ejemplos de enfermedades bacterianas que pueden tratarse con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención incluyen: infección por *Mycobacterium tuberculosis*, bacterias gram-negativas (tales como *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*), bacterias gran-positivas (tales como *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*) y *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*).
- 30 30 Los ejemplos de enfermedades fúngicas que pueden tratarse con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención incluyen: infección por *Aspergillus* y *Candida*.
- 35 35 Los ejemplos de enfermedades parasitarias que pueden tratarse con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención incluyen: malaria, toxoplasma e infección por Leishmania.
- 40 40 Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención está diseñado para ser utilizado en métodos de tratamiento de pacientes, preferiblemente pacientes humanos. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se administrará normalmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender, además del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser mediante inyección, por ejemplo, intravenosa o subcutánea. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede administrarse por vía intravenosa o subcutánea.
- 45 45 50 Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua o solución salina fisiológica. Para inyección subcutánea o intravenosa, o inyección en el sitio de afección, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, o composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, está preferiblemente en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados.
- 55 Una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, simultáneamente o secuencialmente o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, dependiendo de la afección que se va a tratar. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención puede administrarse en combinación con un agente terapéutico existente para la enfermedad que va a tratarse, por ejemplo, un cáncer tal como se mencionó anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención puede administrarse al paciente en combinación con una segunda terapia anticancertera, tal como quimioterapia, vacunación antitumoral (también denominada vacunación contra el cáncer), radioterapia, immunoterapia, un virus oncolítico, terapia de células T de receptor de antígeno químérico (CAR) o terapia hormonal.

Se espera que el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención pueda actuar como un adyuvante en la terapia anticancerosa, tal como quimioterapia, vacunación antitumoral o radioterapia. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la administración del anticuerpo o fragmento del mismo al paciente como parte de la quimioterapia, vacunación antitumoral o radioterapia desencadenará una respuesta inmunitaria mayor contra el antígeno PD-L1 asociado al cáncer, que la que se logra con quimioterapia, vacunación antitumoral o radioterapia sola.

Un método para tratar el cáncer en un paciente puede comprender así administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo según la invención en combinación con un agente quimioterapéutico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterapéutico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal. El agente quimioterapéutico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterapéutico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal es preferiblemente un agente quimioterapéutico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterapéutico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal para el cáncer en cuestión, es decir, un agente quimioterapéutico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterapéutico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal que se ha mostrado que es eficaz en el tratamiento del cáncer en cuestión. La selección de un agente quimioterapéutico, vacuna antitumoral, radionúclido, agente inmunoterapéutico, virus oncolítico, célula CAR-T o agente para terapia hormonal adecuado, que se ha mostrado que es eficaz para el cáncer en cuestión, está dentro de las capacidades del profesional experto.

Por ejemplo, cuando el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo según la invención en combinación con un agente quimioterapéutico, el agente quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en: taxanos, antibióticos citotóxicos, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de PARP, inhibidores de la enzima B_RAF, agentes alquilantes, análogos de platino, análogos de nucleósidos, derivados de talidomida, agentes quimioterapéuticos antineoplásicos y otros. Los taxanos incluyen docetaxel, paclitaxel y nab-paclitaxel; los antibióticos citotóxicos incluyen actinomicina, bleomicina, antraciclinas, doxorrubicina y valrrubicina; los inhibidores de tirosina quinasa incluyen sunitinib, erlotinib, gefitinib, axitinib, PLX3397, imatinib, cobematinib y trametinib; los inhibidores de PARP incluyen pirarapirab; los inhibidores de la enzima B-Raf incluyen vemurafenib y dabrafenib; los agentes alquilantes incluyen dacarbazine, ciclofosfamida, temozolomida; los análogos de platino incluyen carboplatino, cisplatino y oxaliplatino; los análogos de nucleósidos incluyen gemcitabina y azacitidina; los antineoplásicos incluyen fludarabina. Otros agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en la invención incluyen metotrexato, defactinib, entinostat, pemetrexed, capecitabina, eribulina, irinotecán, fluorouracilo y vinblastina.

Las estrategias de vacunación para el tratamiento de cánceres se han implementado en la clínica y se han analizado en detalle en la bibliografía científica (tal como Rosenberg S. Development of Cancer Vaccines. ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000)). Esto implica principalmente estrategias para provocar que el sistema inmunitario responda a diversos marcadores celulares expresados por células cancerosas autólogas o alogénicas usando esas células como método de vacunación, tanto con, como sin, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). El GM-CSF provoca una fuerte respuesta en la presentación de antígenos y funciona particularmente bien cuando se emplea con dichas estrategias.

Cuando un método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo según la invención en combinación con un agente inmunoterapéutico, el agente inmunoterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en: anticuerpos que se unen a un inhibidor del punto de control, molécula coestimuladora o factor soluble, tales como anticuerpos que se unen a CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, VISTA, CD73, CSF-1R, KIR, OX40, CD40, HEV, TGFB, IL-10, CSF-1. Alternativamente, el agente inmunoterapéutico puede ser una o más citocinas o terapias basadas en citocinas seleccionadas del grupo que consiste en IL-2, profármaco de IL2 conjugada, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-9, IL-15, IL-18, IL-21 e interferón de tipo I.

La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta una cantidad que es suficiente para mostrar beneficio para un paciente. Tal beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. Por lo tanto, "tratamiento" de una enfermedad específica se refiere a la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la tasa y el transcurso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando, del paciente particular que se esté tratando, de la afección clínica del paciente individual, de la causa del trastorno, del sitio de administración de la composición, del tipo de anticuerpo o fragmento del mismo, del método de administración, de la programación de la administración y de otros factores conocidos por los médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los sanitarios generales y otros médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de una enfermedad que se está tratando. Las dosis apropiadas de anticuerpo o fragmento del mismo son bien conocidas en la técnica (Ledermann et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; y Bagshawe et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922). Pueden usarse las dosificaciones específicas indicadas en la presente memoria, o en Physician's Desk Reference (2003) según sea apropiado para un anticuerpo o fragmento del mismo que se está administrando. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de un anticuerpo o fragmento del

5 mismo puede determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo a seres humanos. La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo el tamaño y la ubicación del área a tratar, y la naturaleza precisa del miembro de unión específica. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanales o mensuales, a criterio del médico. El tratamiento administrarse antes y/o después de la cirugía, y puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

10 **Descripción detallada**

15 La invención proporciona una molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma capaz de unirse específicamente a PD-L1, que comprende un sitio de unión a antígeno que comprende el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo G1AA/E12v2 de las SEQ ID NO: 27 y 28, respectivamente. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede producirse por medios recombinantes. Un "anticuerpo recombinante" es un anticuerpo que ha sido producido por una célula huésped diseñada por ingeniería de forma recombinante. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según la invención se aísla o purifica, opcionalmente.

20 El término "PD-L1" puede referirse a PD-L1 humano, PD-L1 murino, en particular de ratón, y/o PD-L1 de mono cynomolgus, a menos que el contexto requiera lo contrario. Preferiblemente, el término "PD-L1" se refiere a PD-L1 humano, a menos que el contexto requiera lo contrario.

25 El término "molécula de anticuerpo" describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida de forma parcial o totalmente sintética. La molécula de anticuerpo puede ser humana o humanizada. La molécula de anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo monoclonal. Los ejemplos de anticuerpos son los isotipos de inmunoglobulina, tales como inmunoglobulina G, y sus subclases isotípicas, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como fragmentos de las mismas. Las cuatro subclases humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) contienen cada una, una cadena pesada diferente; pero son altamente homólogas y difieren principalmente en la región bisagra y el grado en el que activan el sistema inmunitario del huésped. IgG1 e IgG4 contienen dos enlaces disulfuro intercatenarios en la región bisagra, IgG2 tiene 4 e IgG3 tiene 11 enlaces disulfuro intercatenarios.

30 35 Los términos "anticuerpo" y "molécula de anticuerpo", como se usan en la presente memoria, incluyen fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab y scFv, siempre que dichos fragmentos comprendan un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1. A menos que el contexto requiera lo contrario, los términos "anticuerpo" o "molécula de anticuerpo", como se usan en la presente memoria, son por tanto equivalentes a "anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo".

40 Los anticuerpos son inmunoglobulinas, que tienen la misma estructura básica que consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras que forman dos brazos Fab que contienen dominios idénticos que están unidos por una región bisagra flexible al tallo del anticuerpo, el dominio Fc, que da la forma clásica de "Y". Los dominios Fab consisten en dos dominios variables y dos constantes, con un dominio pesado variable (VH) y un dominio pesado constante 1 (CH1) en la cadena pesada y un dominio ligero variable (VL) y un dominio ligero constante (CL) en la cadena ligera. Los dos dominios variables (VH y VL) forman el fragmento variable (Fv), que proporciona la especificidad antigenérica del anticuerpo basada en CDR, actuando los dominios constantes (CH1 y VL) como armazón estructural. Cada dominio variable contiene tres bucles hipervariables, conocidos como regiones determinantes de la complementariedad (CDR). En cada uno de VH y VL, las tres CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) están flanqueadas por cuatro regiones marco menos variables (FR) (FR1, FW2, FW3 y FW4) para dar una estructura FW1-CDR1-FW2-CDR2-FW3-CDR3-FW4. Las CDR proporcionan un sitio de reconocimiento de antígeno específico en la superficie del anticuerpo.

45 50 55 En la presente memoria se usa la nomenclatura de numeración de Kabat e ImMunoGeneTics (IMGT). Generalmente, a menos que se indique lo contrario (explícitamente o por el contexto), los residuos de aminoácidos se numeran en la presente memoria según el esquema de numeración de Kabat (Kabat et al., 1991). Para aquellos casos en donde se usa la numeración de IMGT, los residuos de aminoácidos se numeran en la presente memoria según el esquema de numeración de ImMunoGeneTics (IMGT). El esquema de numeración de IMGT se describe en Lefranc et al., 2005.

60 65 Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas químéricas que generalmente retienen la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir las CDR en un marco de inmunoglobulina diferente, o injertar regiones variables en una región constante de inmunoglobulina diferente. La introducción de las CDR de una inmunoglobulina en otra inmunoglobulina se describe, por ejemplo, en EP-A-184187, GB2188638A o EP-A-239400. Alternativamente, un hibridoma u otra célula que produce una molécula de anticuerpo puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Como los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, debe interpretarse que el término "anticuerpo" abarca fragmentos de anticuerpo, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen moléculas químéricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos químéricos se describen en EP-A- 0120694 y EP-A-0125023.

Un ejemplo de un fragmento de anticuerpo que comprende tanto secuencias de CDR como dominio CH3 es un minicuerpo, que comprende un scFv unido a un dominio CH3 (Hu et al., 1996).

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención se une a PD-L1, en particular PD-L1 humano. La unión en este contexto puede referirse a una unión específica. El término "específico" puede referirse a la situación en donde la molécula de anticuerpo no mostrará ninguna unión significativa a moléculas distintas de su o sus parejas de unión específicas, en este caso PD-L1. El término "específico" también es aplicable cuando la molécula de anticuerpo es específica para epítopos particulares, tales como epítopos en PD-L1, que son portados por varios antígenos, en cuyo caso la molécula de anticuerpo será capaz de unirse a los diversos antígenos que portan el epítopo.

Los aminoácidos pueden denominarse por sus códigos de una letra o tres letras, o por su nombre completo. Los códigos de una y tres letras, así como los nombres completos, de cada uno de los veinte aminoácidos estándar se exponen a continuación.

Aminoácidos, códigos de una y tres letras

Aminoácido	Código de una letra	Código de tres letras
alanina	A	Ala
arginina	R	Arg
asparagina	N	Asn
ácido aspártico	D	Asp
cisteína	C	Cys
ácido glutámico	E	Glu
glutamina	Q	Gln
glicina	G	Gly
histidina	H	His
isoleucina	I	Ile
leucina	L	Leu
lisina	K	Lys
metionina	M	Met
fenilalanina	F	Phe
prolina	P	Pro
serina	S	Ser
treonina	T	Thr
triptófano	W	Trp
tirosina	Y	Tyr
valina	V	Val

El anticuerpo anti-PD-L1 de la invención comprende la secuencia de HCDR3 de la SEQ ID NO: 3, la secuencia de HCDR2 de la SEQ ID NO: 18 y la secuencia de HCDR1 de la SEQ ID NO: 1 y el aminoácido en la posición 28 en el VH (Kabat) es prolina.

Una modificación puede ser una sustitución, delección o inserción de aminoácidos. Preferiblemente, la modificación es una sustitución.

En realizaciones en las que uno o más aminoácidos están sustituidos con otro aminoácido, las sustituciones

pueden ser sustituciones conservadoras, por ejemplo, según el siguiente gráfico. En algunas realizaciones, los aminoácidos de la misma categoría en la columna intermedia se sustituyen entre sí, es decir, un aminoácido no polar se sustituye por otro aminoácido no polar, por ejemplo. En algunas realizaciones, los aminoácidos en la misma línea en la columna más a la derecha se sustituyen entre sí.

5

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar – no cargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

En algunas realizaciones, la o las sustituciones pueden ser funcionalmente conservadoras. Es decir, en algunas realizaciones, la sustitución puede no afectar (o puede no afectar sustancialmente) a una o más propiedades funcionales (por ejemplo, afinidad de unión) de la molécula de anticuerpo que comprende la sustitución en comparación con la molécula de anticuerpo sin sustituir equivalente.

10

El anticuerpo de la invención comprende el dominio VH de E12v2 expuesto en la SEQ ID NO: 27.

15

El anticuerpo de la invención comprende el dominio VL de E12v2 expuesto en la SEQ ID NO: 28.

20

La identidad de secuencia se define comúnmente con referencia al algoritmo GAP (paquete Wisconsin GCG, Accelrys Inc, San Diego, EE. UU.). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias completas, maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de huecos. Generalmente, se usan parámetros por defecto, con una penalización de creación de hueco que equivale a 12 y una penalización de extensión de hueco que equivale a 4. Puede preferirse el uso de GAP, pero pueden usarse otros algoritmos, por ejemplo, BLAST (que usa el método de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (que usa el método de Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith-Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), o el programa TBLASTN, de Altschul et al. (1990) supra, empleando generalmente parámetros por defecto. En particular, puede usarse el algoritmo psi-Blast (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402). La identidad de secuencia puede definirse usando el algoritmo Bioedit, ClustalW.

25

El anticuerpo puede comprender un dominio CH2. El dominio CH2 está preferiblemente localizado en el extremo N del dominio CH3, como en el caso de una molécula de IgG humana. El dominio CH2 del anticuerpo es preferiblemente el dominio CH2 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, más preferiblemente el dominio CH2 de IgG1 humana. Las secuencias de dominios de IgG humana son conocidas en la técnica.

30

El anticuerpo puede comprender una región bisagra de inmunoglobulina, o parte de la misma, en el extremo N del dominio CH2. La región bisagra de inmunoglobulina permite que las dos secuencias del dominio CH2-CH3 se asocien y formen un dímero. Preferiblemente, la región bisagra, o parte de la misma, es una región bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, o parte de la misma. Más preferiblemente, la región bisagra, o parte de la misma, es una región bisagra de IgG1, o parte de la misma.

35

La secuencia del dominio CH3 no está particularmente limitada. Preferiblemente, el dominio CH3 es un dominio G de inmunoglobulina humana, tal como un dominio CH3 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, lo más preferiblemente un dominio CH3 de IgG1 humana.

40

Un anticuerpo de la invención puede comprender una región constante de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. Las secuencias de dominios CH3 de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana son conocidas en la técnica.

45

La cadena pesada de la molécula de anticuerpo puede comprender opcionalmente un resto de lisina adicional (K) en el extremo C de la secuencia del dominio CH3 de la cadena pesada.

50

Se sabe que las inmunoglobulinas tienen una arquitectura modular que comprende dominios discretos, que pueden combinarse en una multitud de diferentes maneras para crear formatos de anticuerpos multiespecíficos, por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos o tetraespecíficos. Los formatos de anticuerpos multiespecíficos ejemplares se describen en Spiess et al., 2015 y Kontermann, 2012, por ejemplo. Los anticuerpos de la invención pueden emplearse en tales formatos multiespecíficos.

55

Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede ser una molécula de anticuerpo heterodimérica, tal como una molécula de inmunoglobulina completa heterodimérica, o un fragmento de la misma. En este caso, una parte

del anticuerpo tendrá una secuencia o secuencias como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, cuando el anticuerpo de la invención es una molécula de anticuerpo heterodimérica biespecífica, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera como se describe en la presente memoria emparejadas con una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden un dominio VH y un dominio VL, respectivamente, que se unen a un antígeno distinto de PD-L1. Las técnicas para preparar anticuerpos heterodiméricos se conocen en la técnica e incluyen la tecnología de botones en ojales (KIH), que implica modificar por ingeniería los dominios CH3 de una molécula de anticuerpo para crear un “botón” o un “ojal” para promover la heterodimerización de la cadena. Alternativamente, los anticuerpos heterodiméricos pueden prepararse mediante la introducción de pares de cargas en la molécula de anticuerpo para evitar la homodimerización de dominios CH3 por repulsión electrostática y para dirigir la heterodimerización por atracción electrostática. Los ejemplos de formatos de anticuerpos heterodiméricos incluyen CrossMab, mAb-Fv, cuerpo SEED e IgG KIH.

Alternativamente, una molécula de anticuerpo multiespecífico puede comprender una molécula de inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma y un resto o restos de unión a antígeno adicionales. El resto de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un Fv, scFv o anticuerpo de dominio único, y puede fusionarse a la molécula de inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma. Los ejemplos de moléculas de anticuerpo multiespecíficas que comprenden restos de unión a antígeno adicionales fusionados a una molécula de inmunoglobulina completa incluyen moléculas DVD-IgG, DVI-IgG, scFv4-IgG, IgG-scFv y scFv-IgG (Spiess et al., 2015; Figura 1). Los ejemplos de moléculas de anticuerpo multiespecíficas que comprenden restos de unión a antígeno adicionales fusionados a un fragmento de inmunoglobulina incluyen moléculas BiTE, diacuerpos y moléculas DART, por ejemplo (Spiess et al., 2015; Figura 1). Otros formatos adecuados serían fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

Además del sitio de unión a PD-L1 basado en CDR, por ejemplo, en el VH de un anticuerpo, el anticuerpo puede comprender además uno o más sitios de unión a antígeno adicionales para crear una molécula bi o multiespecífica. El anticuerpo puede comprender un sitio de unión a antígeno basado en CH3 o basado en CH2. Los sitios de unión a antígeno basados en CDR se encuentran en moléculas de inmunoglobulina de origen natural y su estructura es bien conocida en la técnica. Cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un sitio de unión a antígeno basado en CDR, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es preferiblemente una molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo bi o multiespecífico puede comprender un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1 y un sitio de unión basado en CH3 o basado en CH2 para una segunda diana. En una realización preferida, la molécula de anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina G humana, tal como una molécula de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, más preferiblemente una molécula de IgG1 humana.

Opcionalmente, el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo de la invención pueden tener un segundo sitio de unión a antígeno localizado en un dominio constante, preferiblemente CH3 o CH2, del anticuerpo.

Alternativa o adicionalmente, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede comprender un sitio de unión a antígeno basado en CDR adicional (por ejemplo, como se forma por un VH y un VL) para un segundo o tercer antígeno diana. Por lo tanto, una molécula de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de la misma, según la invención puede ser una molécula multiespecífica, preferiblemente biespecífica, que comprende un segundo sitio de unión a antígeno.

El segundo sitio de unión a antígeno, cuando está presente, puede ser un sitio de unión a antígeno basado en CH3 o basado en CH2 o un sitio de unión a antígeno basado en CDR, y puede unirse a un antígeno de manera que se espera que la unión de dicho antígeno sea beneficiosa en el contexto del tratamiento del cáncer.

La molécula de anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico mAb² (TM). Un anticuerpo biespecífico mAb², como se denomina en la presente memoria, es una inmunoglobulina IgG que incluye un sitio de unión a antígeno basado en CDR en cada una de sus regiones variables y al menos un sitio de unión a antígeno en un dominio constante de la molécula de anticuerpo.

En una realización, cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un segundo sitio de unión a antígeno, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno basado en CH3, basado en CH2 o basado en CDR, el segundo sitio de unión a antígeno puede unirse a una molécula de punto de control inhibidora no redundante y complementaria, tal como CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, VISTA, CD73, CSF-1R, KIR, B7-H3, B7-H4, 2B4, NKG2A, CD47, SIRPa, BTLA, CCR4, CD200R o TGFbeta.

La inhibición del eje PD-1/PD-L1 y la estimulación de moléculas coestimuladoras representan estrategias complementarias para potenciar respuestas inmunitarias en pacientes humanos. La inversión del agotamiento de las células T a través del bloqueo del punto de control puede permitir que estas células se activen más potentemente y desarrolle una actividad antitumoral completa. Por tanto, en otra realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede comprender un segundo sitio de unión a antígeno, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno basado en CH3, basado en CH2 o basado en CDR, y el

segundo sitio de unión a antígeno puede unirse a, y ser un agonista para, una molécula coestimuladora expresada por las células T tales como OX40, ICOS, CD40, HVEM, NKG2D o TNFR2.

- 5 En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede comprender un segundo sitio de unión a antígeno, por ejemplo, un sitio de unión a antígeno basado en CH3, basado en CH2 o basado en CDR, y el segundo sitio de unión a antígeno puede unirse a un antígeno asociado a tumor (TAA). Se espera que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo dé como resultado respuestas de células T específicas de tumor a través de la activación inmune localizada. Los ejemplos de TAA son c-Met, B7-H3, B7-H4, EGFR, HER-2, EPCAM, CEACAM, FAP, VEGF, MSLN, GPC3, CD38, CD19 y CD20.
- 10 Como se ha detallado anteriormente, las enfermedades infecciosas muestran muchos paralelismos con la oncología. El papel de PD-L1 en la regulación inmunitaria podría aprovecharse para maximizar la respuesta inmunitaria contra patógenos. La inmunomodulación en el contexto del tratamiento de enfermedades infecciosas es un área emergente de la medicina y las revisiones tempranas sugieren que el bloqueo de PD-L1 puede mejorar las respuestas biológicas a la infección, en particular, ayudar a contrarrestar el agotamiento de las células T, gestionar la eliminación mediada por el sistema inmunitario y generar inmunidad a largo plazo (Wykes y Lewin, 2017).
- 15 En algunas enfermedades infecciosas, las respuestas proinflamatorias exageradas y la actividad subóptima de las células T específicas de antígeno son las causas de daño grave en los tejidos (Rao et al., 2017). Sin desear estar ligado por la teoría, se cree que el uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que comprende un segundo sitio de unión a antígeno puede encontrar aplicación en el tratamiento de estas enfermedades localizando la actividad inmunomoduladora beneficiosa en el entorno del patógeno.
- 20 25 Alternativamente, el uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que comprende un segundo sitio de unión a antígeno que se une a una diana de célula inmunitaria, ya sea por agonismo o antagonismo, puede dar como resultado una especificidad y actividad aumentada de las células T.
- 30 Por tanto, en una realización, cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un segundo sitio de unión a antígeno, el segundo sitio de unión a antígeno puede unirse a una diana de células inmunitarias, tal como PD-1, PD-L2, CTLA-4, LAG-3, TIM3, OX40, CD40, ICOS, CD28 o CD80.
- 35 Alternativamente, cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende un segundo sitio de unión a antígeno, el segundo sitio de unión a antígeno puede unirse a una diana patógena, concretamente un antígeno expresado por un patógeno humano. El patógeno puede ser un virus, bacteria, hongo o parásito. Preferiblemente, el patógeno es un virus, bacteria u hongo. Más preferiblemente, el patógeno es un virus o bacteria. Lo más preferiblemente, el patógeno es un virus. Los ejemplos de antígenos virales incluyen las proteínas p24, gp120 y gp41 expresadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) expresado por el virus de la hepatitis B (VHB) y hemaglutinina y neuramidasa expresadas por el virus de la gripe. Los ejemplos de antígenos bacterianos incluyen Rv1733, Rv2389 y Rv2435n expresados por *Mycobacterium tuberculosis*.
- 40 45 50 En algunas realizaciones, el segundo sitio de unión a antígeno del anticuerpo de la invención puede no unirse a OX40. Además, o alternativamente, el segundo sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención puede no unirse a CD137. Además, o alternativamente, el segundo sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención puede no unirse a CD27. Además, o alternativamente, el segundo sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención puede no unirse a la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR). Además, o alternativamente, el segundo sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención puede no unirse al gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3). Además, o alternativamente, el segundo sitio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención puede no unirse al coestimulador inducible de células T (ICOS).
- 55 Un anticuerpo de la invención puede conjugarse con un modulador del sistema inmunitario, molécula citotóxica, radioisótopo o marcador detectable. El modulador del sistema inmunitario puede ser una molécula citotóxica, tal como una citocina.
- 60 La molécula de anticuerpo puede conjugarse con una molécula bioactiva o un marcador detectable. En este caso, la molécula de anticuerpo puede denominarse conjugado. Dichos conjugados encuentran aplicación en el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades como se describe en la presente memoria.
- 65 Por ejemplo, la molécula bioactiva puede ser un modulador del sistema inmunitario, tal como una citocina, preferiblemente una citocina humana. Por ejemplo, la citocina puede ser una citocina que estimula la activación y/o proliferación de las células T. Los ejemplos de citocinas para la conjugación con la molécula de anticuerpo incluyen IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, GM-CSF e IFN-gamma.
- Alternativamente, la molécula bioactiva puede ser una trampa de ligandos, tal como una trampa de ligandos de una citocina, por ejemplo, de TGF-beta o IL-6.

Los marcadores detectables adecuados que pueden conjugarse con moléculas de anticuerpo se conocen en la técnica e incluyen radioisótopos tales como yodo-125, yodo-131, itrio-90, indio-111 y tecnecio-99; fluorocromos, tales como fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, rojo Texas y derivados de colorantes de cianina, por ejemplo, Cy7 y Alexa750; colorantes cromogénicos, tales como diaminobencidina; perlas de látex; marcadores enzimáticos tales como peroxidasa de rábano picante; colorantes de fósforo o láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas; y restos químicos, tales como biotina, que pueden detectarse mediante la unión a un resto detectable cognado específico, por ejemplo, avidina marcada.

5 El anticuerpo de la invención puede conjugarse con la molécula bioactiva o marcador detectable mediante cualquier enlace covalente o no covalente adecuado, tal como un enlace disulfuro o peptídico. Cuando la molécula bioactiva es una citocina, la citocina puede unirse a la molécula de anticuerpo por medio de un conector peptídico. Los conectores peptídicos adecuados son conocidos en la técnica y pueden tener una longitud de 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 15, de 10 a 25, de 10 a 20 o de 10 a 15 aminoácidos.

10 15 En algunas realizaciones, la molécula bioactiva puede conjugarse con el anticuerpo mediante un conector escindible. El conector puede permitir la liberación de la molécula bioactiva del anticuerpo en un sitio de terapia. Los conectores pueden incluir enlaces amida (por ejemplo, conectores peptídicos), enlaces disulfuro o hidrazonas. Los conectores peptídicos, por ejemplo, pueden escindirse por proteasas específicas de sitio, los enlaces disulfuro pueden escindirse por el entorno reductor del citosol y las hidrazonas pueden escindirse por hidrólisis mediada por ácido.

20 25 El conjugado puede ser una proteína de fusión que comprende el anticuerpo de la invención y la molécula bioactiva. En este caso, la molécula bioactiva puede conjugarse con el anticuerpo mediante un conector peptídico o enlace peptídico. Cuando el anticuerpo es una molécula con múltiples cadenas, tal como cuando la molécula de anticuerpo es o comprende un Fcab o es un mAb², la molécula bioactiva puede conjugarse con una o más cadenas de la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, la molécula bioactiva puede conjugarse con una o ambas de las cadenas pesadas de la molécula de mAb². Las proteínas de fusión tienen la ventaja de ser más fáciles de producir y purificar, facilitando la producción de material de grado clínico.

30 35 La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico como se expone en las reivindicaciones, así como un vector que comprende dicho ácido nucleico o conjunto de ácidos nucleicos.

Cuando el ácido nucleico codifica el dominio VH y VL, o cadena pesada y ligera, de una molécula de anticuerpo de la invención, los dos dominios o cadenas pueden codificarse en dos moléculas de ácido nucleico separadas.

40 Se puede usar una molécula de ácido nucleico aislada para expresar una molécula de anticuerpo de la invención. El ácido nucleico se proporcionará generalmente en forma de un vector recombinante para la expresión. Otro aspecto de la invención proporciona así un vector como se expone en las reivindicaciones. Los vectores adecuados pueden elegirse o construirse, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, fragmentos terminadores, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Preferiblemente, el vector contiene secuencias reguladoras apropiadas para dirigir la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, por ejemplo, fagos o fágemidos, según sea apropiado.

45 Una molécula de ácido nucleico o vector como se describe en la presente memoria puede introducirse en una célula huésped. Las técnicas para la introducción de ácido nucleico o vectores en células huésped están bien establecidas en la técnica y puede emplearse cualquier técnica adecuada. Se conoce en la técnica una variedad de células huésped adecuadas para la producción de moléculas de anticuerpo recombinantes, e incluyen células huésped bacterianas, de levadura, de insecto o de mamífero. Una célula huésped preferida es una célula de mamífero, tal como una célula CHO, NS0 o HEK, por ejemplo, una célula HEK293.

55 55 También se proporciona una célula huésped recombinante como se expone en las reivindicaciones. Tal célula huésped recombinante puede usarse para producir un anticuerpo de la invención. Por tanto, también se proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención como se expone en las reivindicaciones, comprendiendo el método cultivar la célula huésped recombinante en condiciones adecuadas para la producción del anticuerpo. El método puede comprender además una etapa de aislamiento y/o purificación de la molécula de anticuerpo.

60 65 Por tanto, la invención proporciona un método para producir una molécula de anticuerpo de la invención que comprende expresar un ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo en una célula huésped y, opcionalmente, aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo así producida. Los métodos para cultivar células huésped son bien conocidos en la técnica. Las técnicas para la purificación de moléculas de anticuerpo recombinantes son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, HPLC, FPLC o cromatografía de afinidad, por ejemplo, usando Proteína A o Proteína L. En algunas realizaciones, la purificación se puede realizar usando una etiqueta de afinidad en la molécula de anticuerpo. El método también puede comprender

formular la molécula de anticuerpo en una composición farmacéutica, opcionalmente con un excipiente farmacéuticamente aceptable u otra sustancia como se describe a continuación.

5 Se espera que los anticuerpos de la invención encuentren aplicación en aplicaciones terapéuticas, en particular aplicaciones terapéuticas en seres humanos, tales como el tratamiento del cáncer y el tratamiento de enfermedades infecciosas. Por tanto, también se proporciona una composición como se expone en las reivindicaciones, tal como una composición farmacéutica, que comprende una molécula de anticuerpo según la invención y un excipiente, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 La invención proporciona además una molécula de anticuerpo de la invención, para su uso en un método de tratamiento. También se describe, pero no se reivindica, un método para tratar a un paciente, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de anticuerpo según la invención. Se describe adicionalmente, pero no se reivindica, el uso de una molécula de anticuerpo según la invención para su uso en la fabricación de un medicamento. Un paciente, como se 15 denomina en la presente memoria, es preferiblemente un paciente humano.

20 La molécula de anticuerpo de la invención también puede usarse en un método para tratar cáncer en un paciente. También se describe, pero no se reivindica, un método para tratar el cáncer en un paciente, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de anticuerpo según la invención. Se describe adicionalmente, pero no se reivindica, el uso de una molécula de anticuerpo según la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un paciente. El tratamiento puede comprender además administrar al paciente un segundo agente y/o 25 terapia anticancerosa, tal como una vacuna antitumoral y/o un agente quimioterapéutico. El segundo agente y/o terapia anticancerosa se puede administrar al paciente simultáneamente, separadamente o secuencialmente a la molécula de anticuerpo de la invención.

30 Un anticuerpo que se une a PD-L1 según la invención reivindicada puede usarse para a) tratar cáncer, b) retrasar la progresión del cáncer, c) prolongar la supervivencia de un paciente que padece cáncer, o d) estimular una respuesta inmunitaria mediada por células.

35 La invención también puede proporcionar un anticuerpo de la invención, para su uso en un método para tratar una enfermedad infecciosa en un paciente. También se describe, pero no se reivindica, un método para tratar una enfermedad infecciosa en un paciente, en donde el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención. Se describe adicionalmente, pero no se reivindica, el uso de 40 un anticuerpo según la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad infecciosa en un paciente. El tratamiento puede comprender además administrar al paciente un segundo agente y/o terapia para el tratamiento de la enfermedad infecciosa. El segundo agente y/o terapia se puede administrar al paciente simultáneamente, separadamente o secuencialmente al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o molécula de anticuerpo de la invención.

45 Las moléculas de anticuerpo como se describen en la presente memoria pueden ser útiles por tanto para aplicaciones terapéuticas, en particular en el tratamiento del cáncer. Además, se espera que las moléculas de anticuerpo sean útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como enfermedades infecciosas persistentes.

50 Una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede usarse en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal. Los aspectos relacionados incluyen;

- 55 (i) una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria para su uso como medicamento,
- (ii) una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno,
- (iii) el uso de una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

El individuo puede ser un paciente, preferiblemente un paciente humano.

60 El tratamiento puede ser cualquier tratamiento o terapia en donde se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición o el retraso del progreso de la afección, e incluye una reducción en la tasa de progreso, una detención en la tasa de progreso, mejora de la afección, cura o remisión (ya sea parcial o total) de la afección, prevención, mejora, retraso, reducción o detención de uno o más síntomas y/o signos de la afección o prolongación de la supervivencia de un individuo o paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento.

65 También se describe el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis). Por ejemplo, un individuo susceptible a o en riesgo de la aparición o reaparición de una enfermedad tal como cáncer puede tratarse como

se describe en la presente memoria. Tal tratamiento puede prevenir o retrasar la aparición o reaparición de la enfermedad en el individuo.

Un método de tratamiento como se describe puede comprender administrar al menos un tratamiento adicional al individuo además de la molécula de anticuerpo. La molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria puede administrarse por tanto a un individuo sola o en combinación con uno o más tratamientos distintos. Cuando la molécula de anticuerpo se administra al individuo en combinación con otro tratamiento, el tratamiento adicional puede administrarse al individuo simultáneamente con, secuencialmente a o separadamente de la administración de la molécula de anticuerpo. Cuando el tratamiento adicional se administra simultáneamente con la molécula de anticuerpo, la molécula de anticuerpo y el tratamiento adicional pueden administrarse al individuo como una preparación combinada. Por ejemplo, la terapia adicional puede ser una terapia o un agente terapéutico conocido para la enfermedad que se va a tratar.

Aunque una molécula de anticuerpo puede administrarse sola, las moléculas de anticuerpo normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además de la molécula de anticuerpo. Otro aspecto de la invención proporciona por lo tanto una composición farmacéutica que comprende una molécula de anticuerpo según las reivindicaciones. También se describe un método que comprende formular una molécula de anticuerpo en una composición farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, además de la molécula de anticuerpo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente memoria se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, ser humano) sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas u otro problema o complicación, en consonancia con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser por infusión, inyección o cualquier otra vía adecuada, como se analiza a continuación.

Para la administración parenteral, por ejemplo, subcutánea o intravenosa, por ejemplo, mediante inyección, la composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo puede estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica relevante son capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Pueden emplearse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según se requiera, incluyendo tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencílamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinal; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol); polipeptídos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

En algunas realizaciones, las moléculas de anticuerpo pueden proporcionarse en una forma liofilizada para la reconstitución antes de la administración. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo liofilizadas pueden reconstituirse en agua o solución salina estéril antes de la administración a un individuo.

La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio a un individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y el transcurso temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando, del individuo particular que se esté tratando, del estado clínico del individuo, de la causa del trastorno, del sitio de administración de la composición, del tipo de molécula de anticuerpo, del método de administración, de la programación de la administración y de otros factores conocidos por los médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los sanitarios generales y otros médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de una enfermedad que se está tratando. Las dosis apropiadas de moléculas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica (Ledermann et al., 1991; Bagshawe et al., 1991). Pueden usarse dosificaciones específicas indicadas en la presente memoria, o en Physician's Desk Reference (2003) según sea apropiado para una molécula de anticuerpo que se está administrando. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de una molécula de anticuerpo se puede determinar comparando la actividad *in vitro* y la actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo a seres humanos. La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo el tamaño y la ubicación del área a tratar, y la naturaleza

precisa de la molécula de anticuerpo.

Una dosis típica de anticuerpo está en el rango de 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y de 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Esta es una dosis para un único tratamiento de un individuo adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y bebés, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpos en proporción al peso molecular.

Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanales o mensuales, a criterio del médico. El programa de tratamiento para un individuo puede depender de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la composición de anticuerpo, la vía de administración y la naturaleza de la afección que se está tratando.

El tratamiento puede ser periódico, y el período entre las administraciones puede ser de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo, aproximadamente tres semanas o más, aproximadamente cuatro semanas o más, aproximadamente una vez al mes o más, aproximadamente cinco semanas o más, o aproximadamente seis semanas o más. Por ejemplo, el tratamiento puede ser cada dos a cuatro semanas o cada cuatro a ocho semanas. Las formulaciones y vías de administración adecuadas se han descrito anteriormente.

En una realización preferida, una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

El cáncer puede caracterizarse por la proliferación anormal de células cancerosas malignas. Cuando se hace referencia a un tipo particular de cáncer, tal como cáncer de mama, esto se refiere a una proliferación anormal de células malignas del tejido relevante, tal como tejido de mama. Un cáncer secundario que se localiza en la mama, pero que es el resultado de la proliferación anormal de células malignas de otro tejido, tal como tejido ovárico, no es un cáncer de mama como se denomina en la presente memoria, sino un cáncer ovárico.

El cáncer puede ser un cáncer primario o secundario. Por tanto, una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el cáncer es un tumor primario y/o una metástasis tumoral.

Un tumor de un cáncer que se va a tratar usando una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede comprender células que expresan PD-L1, por ejemplo, en su superficie celular. En una realización, se puede haber determinado que el tumor comprende células que expresan PD-L1. Los métodos para determinar la expresión de un antígeno en una superficie celular son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, citometría de flujo.

Por ejemplo, el cáncer que se va a tratar usando una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria se puede seleccionar del grupo que consiste en leucemias, tales como leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y leucemia linfocítica crónica (CLL); linfomas, tales como linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple; y cánceres sólidos, tales como sarcomas (por ejemplo, sarcomas de tejidos blandos), cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células de Merkel), melanoma, cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma urotelial), cáncer de cerebro (glioblastoma multiforme), cáncer de mama, cáncer uterino/endometrial, cáncer de ovario (por ejemplo, cistadenoma seroso ovárico), cáncer de próstata, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)), cáncer colorrectal (por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal), cáncer de cuello de útero (por ejemplo, cáncer de células escamosas de cuello de útero y adenocarcinoma de cuello de útero), cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer renal (por ejemplo, cáncer de células renales), cáncer adrenal, cáncer de estómago (por ejemplo, adenocarcinoma de estómago), cáncer testicular, cáncer de la vesícula biliar y los tractos biliares (por ejemplo, colangiocarcinoma), cáncer de tiroides, cáncer de timo, cáncer de huesos y cáncer cerebral.

En una realización preferida, el cáncer que se va a tratar usando una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria es un cáncer sólido. Más preferiblemente, el cáncer que se va a tratar usando una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria es un cáncer sólido seleccionado del grupo que consiste en: sarcoma, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer uterino/endometrial, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer renal y cáncer de estómago.

En el contexto del cáncer, el tratamiento puede incluir inhibir el crecimiento del cáncer, incluyendo la remisión completa del cáncer, y/o inhibir la metástasis del cáncer, así como inhibir la recurrencia del cáncer. El crecimiento del cáncer se refiere generalmente a uno cualquiera de varios índices que indican el cambio dentro del cáncer a una forma más desarrollada. Por tanto, los índices para medir una inhibición del crecimiento del cáncer incluyen una disminución en la supervivencia de las células cancerosas, una disminución en el volumen

- o morfología del tumor (por ejemplo, como se determina usando tomografía computarizada (CT), sonografía u otro método de imagenología), un crecimiento tumoral retardado, una destrucción de la vasculatura tumoral, rendimiento mejorado en la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada, un aumento en la actividad de las células inmunitarias anticancerosas u otras respuestas inmunitarias anticancerosas y una disminución en los niveles de antígenos específicos de tumor. La activación o potenciación de respuestas inmunitarias frente a tumores cancerosos en un individuo puede mejorar la capacidad del individuo para resistir el crecimiento del cáncer, en particular el crecimiento de un cáncer ya presente en el sujeto y/o disminuir la propensión al crecimiento del cáncer en el individuo.
- En el contexto del tratamiento del cáncer, una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede administrarse a un individuo en combinación con otro agente terapéutico o terapia anticancerosa, tal como un agente terapéutico o terapia anticancerosa que se ha mostrado que es adecuado, o se espera que sea adecuado, para el tratamiento del cáncer en cuestión. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede administrarse al individuo en combinación con un agente quimioterapéutico, radioterapia, un agente inmunoterapéutico, una vacuna antitumoral, un virus oncolítico, una terapia de transferencia celular adoptiva (ACT) (tal como terapia adoptiva de células NK o terapia con células T de receptor de antígeno químérico (CAR), linfocitos infiltrantes de tumores autólogos (TIL) o células T gamma/delta, o un agente para terapia hormonal.
- Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria puede actuar como un adyuvante en la terapia anticancerosa. Específicamente, se cree que la administración de la molécula de anticuerpo a un individuo en combinación con quimioterapia y/o radioterapia, o en combinación con una vacuna antitumoral, por ejemplo, desencadenará una respuesta inmunitaria mayor contra el cáncer que la que se logra con quimioterapia y/o radioterapia, o con una vacuna antitumoral, sola.
- Uno o más agentes quimioterapéuticos para administración en combinación con un anticuerpo de la invención como se describe en la presente memoria se pueden seleccionar del grupo que consiste en: taxanos, antibióticos citotóxicos, inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de PARP, inhibidores de la enzima B-Raf, inhibidores de MEK, inhibidores de c-MET, inhibidores de VEGFR, inhibidores de PDGFR, agentes alquilantes, análogos de platino, análogos de nucleósidos, antifolatos, derivados de talidomida, agentes quimioterapéuticos antineoplásicos y otros. Los taxanos incluyen docetaxel, paclitaxel y nab-paclitaxel; los antibióticos citotóxicos incluyen actinomicina, bleomicina y antraciclinas tales como doxorubicina, mitoxantrona y valrubicina; los inhibidores de tirosina quinasa incluyen erlotinib, gefitinib, axitinib, PLX3397, imatinib, cobematinib y trametinib; los inhibidores de PARP incluyen pirarapirab; los inhibidores de la enzima B-Raf incluyen vemurafenib y dabrafenib; los agentes alquilantes incluyen dacarbazine, ciclofosfamida y temozolomida; los análogos de platino incluyen carboplatino, cisplatino y oxaliplatino; los análogos de nucleósidos incluyen azacitidina, capecitabina, fludarabina, fluorouracilo y gemcitabina; los antifolatos incluyen metotrexato y pemetrexed. Otros agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en la presente invención incluyen defactinib, entinostat, eribulin, irinotecán y vinblastina.
- Los agentes terapéuticos preferidos para la administración con una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria son doxorubicina, mitoxantrona, ciclofosfamida, cisplatino y oxaliplatino.
- Una radioterapia para administración en combinación con una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser radioterapia de haz externo o braquiterapia.
- Un agente inmunoterapéutico para administración en combinación con una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser una molécula de anticuerpo terapéutica, ácido nucleico, citocina o terapia basada en citocinas. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo terapéutica puede unirse a una molécula reguladora inmunitaria, por ejemplo, una molécula inhibidora de punto de control o una molécula coestimuladora inmunitaria, un receptor del sistema inmunitario innato, o un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral de superficie celular o un antígeno tumoral soluble. Los ejemplos de moléculas inmuno reguladoras a las que puede unirse la molécula de anticuerpo terapéutico incluyen CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, VISTA, PD-1, CD47, CD73, CSF-1R, KIR, OX40, CD40, HVEM, IL-10 y CSF-1. Los ejemplos de receptores del sistema inmunitario innato al que puede unirse la molécula de anticuerpo terapéutico incluyen receptores de tipo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9, RIG-I (por ejemplo, RIG-I y MDA-5), y STING. Los ejemplos de antígenos tumorales a los que puede unirse la molécula de anticuerpo terapéutico incluyen HER2, EGFR, CD20 y TGF-beta.
- El ácido nucleico para administración en combinación con una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser un ARNsi.
- Las citocinas o la terapia basada en citocinas se pueden seleccionar del grupo que consiste en: IL-2, profármaco de IL-2 conjugada, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-9, IL-15, IL-18, IL-21 e interferón de tipo I.
- Las vacunas antitumorales para el tratamiento del cáncer se han implementado en la clínica y se han analizado en detalle en la bibliografía científica (tal como Rosenberg S. Development of Cancer Vaccines. ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000)). Esto implica principalmente estrategias para provocar que el sistema

inmunitario responda a diversos marcadores celulares expresados por células cancerosas autólogas o alogénicas usando esas células como método de vacunación, tanto con, como sin, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). El GM-CSF provoca una fuerte respuesta en la presentación de antígenos y funciona particularmente bien cuando se emplea con dichas estrategias.

5 El agente quimioterapéutico, radioterapia, agente inmunoterapéutico, vacuna antitumoral, virus oncolítico, terapia ACT o agente para terapia hormonal es preferiblemente un agente quimioterapéutico, radioterapia, agente inmunoterapéutico, vacuna antitumoral, virus oncolítico, terapia ACT o agente para terapia hormonal para el cáncer en cuestión, es decir, un agente quimioterapéutico, radioterapia, agente inmunoterapéutico, vacuna antitumoral, virus oncolítico, terapia ACT o agente para terapia hormonal que se ha mostrado que es eficaz en el tratamiento del cáncer en cuestión. La selección de un agente quimioterapéutico, radioterapia, agente inmunoterapéutico, vacuna antitumoral, virus oncolítico, terapia ACT o agente para terapia hormonal adecuados que se ha mostrado que es eficaz para el cáncer en cuestión está dentro de las capacidades del profesional experto.

10 15 En algunas realizaciones para uso terapéutico potencial, se prefiere un anticuerpo que no activa funciones efectoras.

20 25 Se ha usado IgG4, pero esta subclase se somete a intercambio de brazo Fab, donde las cadenas pesadas se pueden intercambiar entre IgG4 *in vivo*. Debido a su falta de funciones efectoras, los anticuerpos IgG4 representan la subclase de IgG preferida para el bloqueo del receptor sin agotamiento celular. Las moléculas de IgG4 pueden intercambiar semi-moléculas en un proceso dinámico denominado intercambio de brazo Fab. Este fenómeno puede ocurrir entre anticuerpos terapéuticos e IgG4 endógena. Se ha mostrado que la mutación S228P evita este proceso de recombinación permitiendo el diseño de anticuerpos IgG4 terapéuticos menos impredecibles.

30 35 40 45 50 Se sabe que el dominio CH2 se une a receptores Fcγ y complemento. La unión del dominio CH2 a los receptores Fcγ es citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), mientras que la unión al complemento es citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) requerida. El dominio CH2 de la molécula de anticuerpo comprende preferiblemente una o más mutaciones que reducen o anulan la unión del dominio CH2 a uno o más receptores Fcγ, tales como FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIII y/o al complemento. Los inventores postulan que la reducción o supresión de la unión a receptores Fcγ disminuirá o eliminará la ADCC mediada por la molécula de anticuerpo. De manera similar, se espera que la reducción o supresión de la unión al complemento reduzca o elimine la CDC mediada por la molécula de anticuerpo. Sin desear estar limitado por la teoría, se espera que esto reduzca o evite la inflamación hepática cuando la molécula de anticuerpo se administra a un paciente. Además, se espera que la reducción o supresión de la unión a receptores Fcγ sea útil cuando la molécula de anticuerpo comprende un segundo sitio de unión a antígeno para un antígeno de células inmunitarias como se describe en la presente memoria, donde se debe evitar la destrucción mediada por ADCC y/o CDC de células inmunitarias unidas por la molécula de anticuerpo. Las mutaciones para disminuir o anular la unión del dominio CH2 a uno o más receptores Fcγ y/o complemento se conocen en la técnica (Wang et al., 2018). Estas mutaciones incluyen la "mutación LALA" descrita en Bruhns et al., 2009 y Hezareh et al., 2001, que implica la sustitución de los residuos de leucina en las posiciones 1.3 y 1.2 de IMGT del dominio CH2 con alanina (L1.3A y L1.2A). Alternativamente, la generación de anticuerpos a-glicosilo a través de la mutación del sitio de glicosilación unido a N conservado mutando la asparagina (N) en la posición IMGT 84.4 del dominio CH2 a alanina, glicina o glutamina (N84.4A, N84.4G o N84.4Q) también se sabe que disminuye la función efectora de IgG1 (Wang et al., 2018). Como alternativa adicional, se sabe que la activación del complemento (unión a C1q) y la ADCC se reducen a través de la mutación de la prolina en la posición 114 de IMGT del dominio CH2 a alanina o glicina (P114A o P114G) (Idusogie et al., 2000; Klein et al., 2016). Estas mutaciones también pueden combinarse para generar moléculas de anticuerpo con actividad ADCC o CDC adicionalmente reducida o nula.

55 50 Por tanto, la molécula de anticuerpo puede comprender un dominio CH2, en donde el dominio CH2 comprende preferiblemente:

- (i) residuos de alanina en las posiciones 1.3 y 1.2; y/o
- (ii) una alanina o glicina en la posición 114; y/o
- (iii) una alanina, glutamina o glicina en la posición 84.4;

60 en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.

En una realización preferida, la molécula de anticuerpo comprende un dominio CH2, en donde el dominio CH2 comprende:

65 (i) un residuo alanina en la posición 1.3; y

(ii) un residuo de alanina en la posición 1.2;

en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.

5 En una realización preferida alternativa, la molécula de anticuerpo comprende un dominio CH2, en donde el dominio CH2 comprende:

(i) un residuo alanina en la posición 1.3;

10 (ii) un residuo de alanina en la posición 1.2; y

(iii) una alanina en la posición 114;

en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.

15 La IgG persiste naturalmente durante un período prolongado en suero debido al reciclaje mediado por FcRn, dándole una semivida típica de aproximadamente 21 días. Para prolongar la semivida, la interacción dependiente del pH del dominio Fc con FcRn se ha modificado por ingeniería para aumentar la afinidad a pH 6,0 mientras se retiene la unión mínima a pH 7,4. Las mutaciones T250Q/M428L conferían un aumento de 20 aproximadamente 2 veces en la semivida de IgG en monos rhesus. La variante M252Y/S254T/T256E (YTE en abreviatura), confería un aumento de aproximadamente 4 veces en la semivida de IgG en monos cynomolgus. En algunas circunstancias, es deseable una semivida más larga para disminuir la frecuencia de administración mientras se mantiene o mejora la eficacia del anticuerpo administrado. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse como variantes con semivida extendida, modificadas por ingeniería para extender la semivida 25 en suero *in vivo* después de la administración, por lo que los anticuerpos de la invención pueden proporcionarse como variantes T250Q/M428L o M252Y/S254T/T256E.

30 Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden ser útiles en la detección de PD-L1, en particular en la detección de células que comprenden PD-L1 en su superficie celular, es decir, células que expresan PD-L1 unido a la superficie celular. Las células pueden ser células inmunitarias, tales como células T CD8⁺, células T CD4⁺, células Treg, células B, células NK, células NKT, células dendríticas o TIL, pero preferiblemente son células T CD8⁺ o TIL.

35 Por tanto, la presente invención se refiere al uso de una molécula de anticuerpo para detectar la presencia de PD-L1, preferiblemente la presencia de células que comprenden PD-L1 en su superficie celular, en una muestra. La molécula de anticuerpo puede conjugarse con un marcador detectable como se describe en otra parte en la presente memoria.

40 También se proporciona un método *in vitro* de detección de PD-L1, en donde el método comprende incubar la molécula de anticuerpo con una muestra de interés, y detectar la unión de la molécula de anticuerpo a la muestra, en donde la unión del anticuerpo a la muestra indica la presencia de PD-L1. La unión de la molécula de anticuerpo a una muestra puede detectarse usando un ELISA, por ejemplo.

45 En la presente memoria se describe un método *in vitro* de detección de células que comprenden PD-L1 en su superficie celular, en donde el método comprende incubar la molécula de anticuerpo con una muestra celular de interés, y determinar la unión de la molécula de anticuerpo a células presentes en la muestra, en donde la unión del anticuerpo a células presentes en la muestra indica la presencia de células que comprenden PD-L1 en su superficie celular. Los métodos para detectar la unión de una molécula de anticuerpo a células son conocidos en la técnica e incluyen ELISA y citometría de flujo.

50 La muestra celular de interés puede ser una muestra tumoral obtenida de un individuo.

Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden ser útiles por tanto en la detección o diagnóstico de una enfermedad o trastorno, en particular la detección o diagnóstico de cáncer. El cáncer puede ser un cáncer que 55 puede tratarse con una molécula de anticuerpo de la invención como se describe en la presente memoria.

Los aspectos relacionados incluyen, por tanto;

- 60 (i) una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria para su uso como diagnóstico,
- (ii) una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria para su uso en un método para detectar o diagnosticar una enfermedad o trastorno, tal como cáncer,
- (iii) el uso de una molécula de anticuerpo descrita en la presente memoria en la fabricación de un producto 65 de diagnóstico para su uso en la detección o diagnóstico de una enfermedad o trastorno;
y

- (iv) un kit para su uso en un método para detectar o diagnosticar una enfermedad o trastorno en un individuo, comprendiendo el kit una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria.
- 5 "y/o" cuando se usa en la presente memoria debe tomarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, al igual que si cada uno se expusiera individualmente en la presente memoria.
- 10 A menos que el contexto indique lo contrario, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención y se aplican igualmente a todos los aspectos y realizaciones que se describen.
- 15 Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora a modo de ejemplo y con referencia a las figuras proporcionadas en la presente memoria.

Lista de figuras

- 20 Figura 1: Ensayo de reacción mixta de leucocitos. La actividad funcional de los clones kappa anti-PD-L1, G1/894_8_E05, G1/887_4_E12 y G1/887_4_G12, se ensayó en un ensayo de reacción mixta de leucocitos. Todos los mAb anti-PD-L1 mostraron una potente actividad con valores de CE₅₀ inferiores a 0,030 nM. No se observó actividad para el control negativo G1AA/4420.
- 25 Figura 2: Ensayo de activación de células T de ratón DO11.10. La actividad funcional de los clones kappa anti-PD-L1, G1/894_8_E05, G1/887_4_E12 y G1/887_4_G12, hacia PD-L1 de ratón se ensayó en un ensayo de células T con células LK35.2 que sobreexpresaban PD-L1 de ratón y células T DO11.10. Todos los mAb anti-PD-L1 mostraron una potente actividad con valores de CE₅₀ en el rango nanomolar bajo. No se observó actividad para el control negativo G1AA/4420.
- 30 Figura 3: Farmacocinética de mAb anti-PD-L1 en ratones que no portan tumor.
- Figura 4: Ensayo de reacción mixta de leucocitos. La actividad funcional de los clones kappa anti-PD-L1, G1AA/E05v2, G1AA/E12v2 y G1AA/G12v2 se ensayó en un ensayo de reacción mixta de leucocitos. Todos los mAb anti-PD-L1 mostraron una potente actividad con valores de CE₅₀ inferiores a 0,055 nM. No se observó actividad para el control negativo G1AA/4420.

Ejemplos

- 40 El objetivo de estos experimentos fue generar un mAb anti-PD-L1 humano que reaccionara de forma cruzada con PD-L1 de ratón y/o cynomolgus y que fuera un potente inhibidor (bloqueante) de la actividad de PD-1/PD-L1.

Ejemplo 1: Aislamiento de mAb de unión anti-PD-L1 sin tratamiento previo: 280_02_G02

- 45 1.1 Antígenos: PD-L1 humano y de ratón etiquetado con CD4 y Fc
Se generaron antígenos PD-L1 humanos y de ratón con proteínas de fusión para su uso en selecciones y cribado de anticuerpos. Los antígenos se expresaron con una etiqueta monomérica de CD4 de rata C-terminal, dominios 3 y 4 (rCd4) (Brown y Barclay, 1994) o un dominio Fc de IgG1 humana dimérica (dando como resultado hPD-L1-rCD4-His (SEQ ID NO: 79), hPD-L1-Fc-His (SEQ ID NO: 80), mPD-L1-rCD4-His (SEQ ID NO: 81) y mPD-L1-Fc-His (SEQ ID NO: 82). La producción de antígenos en dos formatos diferentes permitió la eliminación de los ligantes de etiquetas durante los cribados secuenciales de presentación de anticuerpos en fagos. Los plásmidos de expresión que codificaban los antígenos se transfecaron en células HEK293 como se describe por Chapple et al., 2006. Los sobrenadantes se recogieron 5 días después de la transfección y los antígenos secretados se purificaron por cromatografía de afinidad en Ni-NTA sefarosa (Schofield et al., 2007).
- 50 55 El antígeno biotinilado se preparó usando el reactivo EZ-link Sulfo-NHS-Biotina (Thermo Fisher Scientific, código de producto 21326) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El producto de la reacción de biotinilación se filtró en gel y se recogió la fracción monomérica. La fracción monomérica se usó para todas las selecciones de presentación en fago en fase de solución. El número promedio de biotinas por molécula fue de 1 a 3 biotinas por monómero de PD-L1 según se determinó usando el kit de cuantificación de fluorescencia de biotina (Thermo Fisher Scientific, código de producto 46610).

1.2 Selecciones

- 65 1.2.1 Diseño de bibliotecas
Se empleó la biblioteca de presentación en fago de anticuerpo humano "IONTAS 1" (IONTAS Ltd.) para

seleccionar clones anti-PD-L1. Los genes de anticuerpo usados para construir la biblioteca IONTAS 1 se derivaron de linfocitos humanos (42 donaciones de capa leucocitaria) y una muestra de tejido de amígdala. Tanto las capas leucocitarias como el tejido de amígdala se obtuvieron con la aprobación del Comité Ético de Investigación Local.

5

1.2.2 Selección en fase sólida sin tratamiento previo

Se realizaron tres rondas de selecciones en fase sólida con la biblioteca de expresión en fago de anticuerpo IONTAS 1 usando antígeno que se revistió directamente sobre tubos Nunc de poliestireno como se describe por Schofield et al., 2007. La primera, segunda y tercera rondas de selección emplearon PD-L1-Fc-His humano (SEQ ID NO: 80), PD-L1-rCD4-His de ratón (SEQ ID NO: 81) y PD-L1-Fc-His humano (SEQ ID NO: 80), respectivamente. En la primera ronda, se recubrieron inmunotubos Nunc Maxisorp (Thermo Scientific, 444202) durante la noche con 10 µg/ml de PD-L1-Fc-His humano para la selección directa. Al día siguiente, los tubos se enjuagaron 2x en PBS y después se bloquearon llenando la parte superior con PBS Marvel al 2 %/PBS (MPBS) y se incubaron durante 1 hora, después los tubos se lavaron tres veces con PBS. Además, la biblioteca de expresión en fago de anticuerpo IONTAS 1 (500 µl) se bloqueó con MPBS al 4 % (500 µl) durante 1 hora. A cada inmunotubo recubierto con antígeno, se le añadieron MPBS al 2 % (179,25 µl), Fc-His (10,75 µl, 2,8 mg/ml) y biblioteca de presentación en fagos de anticuerpos IONTAS 1 bloqueada (110 µl, 2 x 10¹² unidades formadoras de colonias, MPBS al 2 %). Se añadió Fc-His a la selección para eliminar la unión de los ligantes anti-Fc al antígeno etiquetado con Fc inmovilizado en fase sólida. Se permitió que la biblioteca de expresión en fago de anticuerpo se uniera al antígeno directamente inmovilizado durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Despues de este tiempo, los inmunotubos se lavaron 6 veces con PBS-T (PBS, pH 7,4, Tween™-20 al 0,1 %), después se lavó 6 veces con PBS. Los fagos unidos se eluyeron y propagaron usando procedimientos estándar de recuperación de fagos. La segunda ronda de selección por presentación en fago de anticuerpo se realizó como anteriormente, excepto que se usó PD-L1-rCd4-His de ratón (SEQ ID NO: 81) para recubrir el tubo inmunosorb Nunc, se usó rCd4-His en lugar de Fc-His para la desección y se usó el fago resultante de la ronda 1, seleccionado contra PD-L1-Fc-His humano, como población de fago de entrada. La tercera ronda con PD-L1-Fc-His humano se realizó exactamente como la ronda 1.

30

1.2.3 Barajado de cadenas y selecciones en fase de solución

La población de anticuerpos anti-PD-L1 pesados variables (VH) seleccionada se barajó con una población de anticuerpos ligeros variables (VL) sin tratamiento previo como se describe por Dyson et al., 2011, y esta población de presentación en fagos de anticuerpos barajada, rescatada se empleó en selecciones en fase en solución. Brevemente, se realizó la selección con PD-L1-rCd4-His humano (SEQ ID NO: 79) (10 nM), PD-L1-rCd4-His humano (SEQ ID NO: 79) (200 pM) y PD-L1-rCd4-His de ratón (SEQ ID NO: 81) (10 nM) en las rondas 1, 2 y 3, respectivamente, y esto dio como resultado una población de scFv anti-PD-L1 de salida denominada "Selección 280". Esta población de scFv contenía scFv de unión anti-PD-L1 humano y de ratón, según lo determinado por un ELISA policlonal de fago realizado como se describe por Dyson et al., 2011, y mostró una reactividad cruzada mínima con PD1 humano o con etiquetas rCd4 o Fc.

45

1.3 Cribado: ELISA, ensayo de bloqueo recombinante, ensayo de bloqueo basado en células

1.3.1 ELISA de scFv monoclonal

50

La población de scFv de la Selección 280 del Ejemplo 1.2.3 se cribó por ELISA para identificar los clones que se unían mejor a PD-L1 humano. La población de scFv se subclonó en el vector soluble de scFv pSANG10 y se prepararon cultivos de *E. coli* que contenían scFv solubles como se describe (Martin et al., 2006; Studier, 2005). Se usaron entonces scFv solubles en un ELISA monoclonal con PD-L1-rCd4-His humano inmovilizado (SEQ ID No 79). Brevemente, se recubrieron placas Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific, 437111) con PD-L1-rCd4-His humano (SEQ ID NO: 79) (5 µg/ml, PBS) durante la noche, se bloquearon con MPBS al 2 % durante 1 hora y se añadió sobrenadante de cultivo de *E. coli* (dilución 1:2 con 2x MPBS al 2 %) y se permitió que los scFv se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectaron los scFv unidos con anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma, F1804) marcado con europio. Se cribó un total de 470 clones y esto dio como resultado la identificación de 346 clones anti-PD-L1 con una señal de unión para PD-L1 al menos 10 veces por encima del fondo en comparación con los pocillos bloqueados "vacíos" que no contenían antígenos. Los 192 mejores clones de anti-PD-L1 humano evaluados por la señal de ELISA primario se seleccionaron para análisis adicional.

60

1.3.2 Cribado de scFv en ensayo de bloqueo de PD-L1/PD-1 basado en ELISA

65

Para identificar los clones que bloqueaban la interacción entre PD-L1 y PD1, se realizó un ELISA para cribar los scFv de bloqueo. Brevemente, se recubrieron placas Nunc maxisorb (437111, Thermo Fisher Scientific) con anticuerpo anti-rCd4 (dominios 3 y 4) (MCA1022, OX-68, Bio-Rad) durante la noche, se bloquearon con MPBS al 3 % y se incubaron con PD1-rCd4-His humano (SEQ ID NO: 79) (5 µg/ml en MPBS al 3 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se mezcló previamente PD-L1-Fc-His humano biotinilado (SEQ ID NO: 79) (50 µl, 0,2 nM) con sobrenadante de cultivo de *E. coli* que contenía scFv. Las placas de 96 pocillos Nunc se lavaron 3

5 veces con PBS, Tween™-20 al 0,1 % (PBS-T) y 3 veces con PBS, después se añadió la mezcla de PD-L1-Fc-His humano/scFv y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se detectó PD-L1-Fc-His humano unido usando anti-Fc-biotina de cabra (Jackson ImmunoResearch, 109-065-098, Laboratories, 0,1 µg/ml, MPBS al 3 %) y estreptavidina-europio (Perkin Elmer, 1244-360) seguido de solución de potenciación DELFIA (Perkin Elmer, 4001-0010). De 192 clones cribados, 183 mostraron al menos un 90 % de actividad de bloqueo en comparación con el medio de control. Los 183 clones de scFv anti-PD-L1 identificados se cribaron adicionalmente para determinar la reactividad cruzada con PD-L1 de ratón en un ELISA primario, como se describe en el Ejemplo 1.3.1, pero usando PD-L1-rCD4-His de ratón inmovilizado en lugar de PD-L1 humano. Esto identificó 50 clones anti-PD-L1 con con reactividad cruzada de ratón, que eran 10 candidatos para la conversión al formato de IgG1.

1.3.3 Conversión de clones scFv anti-PD-L1 bloqueantes en formato IgG1

15 Los clones de scFv anti-PD-L1 que bloquearon la interacción entre PD-L1 y PD1 se convirtieron en formato de IgG1 subclonando los genes de VL y VH en el plásmido de expresión de IgG1 pINT3-IgG1 y se expresaron en HEK293 a una escala de 4 ml como se describe por Chapple et al., 2006. Los anticuerpos se purificaron por afinidad por lotes con perlas de Proteína A-sefarosa (PC-A100) y columnas de midi-spin "por lotes de 1 etapa" de Proteus (Generon, GEN-1SB08) según las instrucciones del fabricante. La diátesis de los anticuerpos purificados se realizó con tubos GeBAflex maxi, con un punto de corte de 8 kDa (Generon, D045). Si fue necesario, los anticuerpos se concentraron hasta 2 µM por ultrafiltración.

1.3.4 Cribado de la actividad bloqueante de PD-L1/PD-1 en el ensayo de cocultivo de informador Jurkat-NFAT

25 La actividad funcional de los mAb anti-PD-L1 purificados se evaluó después en un cribado de ensayo de informadores en cocultivo. Este cribado se realizó usando la línea celular Jurkat estable GloResponse NFAT-luc2/PD-1 (Promega, CS187102) y células PD-L1 de descongelación y uso (Promega, CS178103) según las instrucciones del fabricante. Las células PD-L1 se sembraron en placas en medio HAM'S-F12 que contenía FBS al 10 %. Al día siguiente, se resuspendieron células informadoras PD-1 Jurkat (Promega, CS187102) en medio de ensayo (RPMI1640 al 90 %, FBS al 1 %). Se retiró el medio de la placa que contenía células PD-L1 30 adheridas y se añadieron 40 µl de medio de ensayo que contenía diferentes anticuerpos a una concentración 2x (200 nM) seguido de 40 µl de la mezcla de células PD-1 a las células adheridas. La placa se incubó durante 6 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se añadió reactivo BioGlo (Promega, G7940, 80 µl) a cada pocillo y se leyó la salida de luciferasa usando un lector de placas BMG pherastar. Esto identificó al anticuerpo G1/280_02_G02 como capaz de bloquear la interacción de PD-L1 con PD1 en un ensayo de cocultivo, según lo determinado 35 por el aumento de la actividad de luciferasa en comparación con los controles sin anticuerpo. Esta actividad se confirmó en un ensayo de cocultivo de respuesta a la dosis (rango de concentración de duplicación: 200 a 1,56 nM) que dio como resultado una concentración eficaz mitad de la máxima (CE₅₀) calculada de 4,2 nM.

1.4 Optimización de secuencias

40 El análisis preliminar de la secuencia del anticuerpo G1/280_02_G02 dio como resultado la identificación de un sitio de desamidación potencial en el VH-CDR2, específicamente un resto NG en las posiciones 54 a 55 de Kabat. Como la desamidación en este sitio podría afectar potencialmente a la unión, se produjeron clones variantes en los que el resto NG se cambió a NA, NS, SG o GG. Estas modificaciones no dieron como resultado ninguna reducción significativa en la afinidad por PD-L1 recombinante o en la potencia en la actividad bloqueante de PD-L1, y el clon variante que contenía la modificación NS, designado G1/280_02_G02_NS, se eligió para su uso en un barajado de cadenas ligeras.

1.5 Resumen de selecciones sin tratamiento previo

50 Las estrategias de selección de fagos empleadas identificaron más de 50 clones de unión anti-PD-L1 humano con una actividad bloqueante potente de PD-1/PD-L1 *in vitro*, así como reactividad cruzada con PD-L1 de ratón. En particular, G1/280_02_G02 mostró una activación potente en un ensayo informador de PD-L1 basado en células y, por lo tanto, se seleccionó para una optimización adicional.

55 Ejemplo 2: Barajado de cadenas para generar clones anti-PD-L1 que contienen cadenas ligeras kappa

60 El anticuerpo G1/280_02_G02_NS posee una cadena ligera lambda. Como la mayoría de los anticuerpos monoclonales usados en un contexto clínico hasta la fecha tienen cadenas ligeras kappa (Jain et al., 2017), se buscó, mediante el uso de una campaña de barajado de cadenas, generar clones que comprendieran la cadena pesada del anticuerpo G1/280_02_G02_NS, pero emparejada con cadenas ligeras kappa, que retuvieran la afinidad por PD-L1 humano y reactividad cruzada con ratón. Se usó la biblioteca de cadenas ligeras kappa IONTAS™ en el plásmido de presentación en fago pIONTAS-1 (biblioteca kappa) para preparar una biblioteca barajada de cadenas ligeras de clones de scFv que comprendiera la cadena pesada del anticuerpo G1/280_02_G02_NS acoplada con variantes de cadena ligera.

2.1 Selección de fagos y estrategia de cribado

Se realizaron varias selecciones de solución de presentación en fagos en tres rondas usando antígenos PD-L1-rCD4-His humanos biotinilados (SEQ ID NO: 79) y PD-L1-rCD4-His de ratón (SEQ ID NO: 81). Las selecciones se realizaron disminuyendo las concentraciones de antígeno en cada ronda (variando de 100 a 0,02 nM) y para cada ronda de selección se usó un control "sin antígeno". Los detalles de las selecciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

No. de selección	Antígeno	Biblioteca de entrada	Ronda
866	hPD-L1; 100 nM	Biblioteca con barajado de cadenas	1
867	hPD-L1; 10 nM	Biblioteca con barajado de cadenas	1
868	hPD-L1; 1 nM	Biblioteca con barajado de cadenas	1
869	hPD-L1; 1 nM	Resultado de 867	2
870	hPD-L1; 0,2 nM	Resultado de 867	2
871	hPD-L1; 0,1 nM	Resultado de 868	2
872	hPD-L1; 0,02 nM	Resultado de 868	2
887	hPD-L1; 0,1 nM	Resultado de 869	3
888	mPD-L1; 1,0 nM	Resultado de 869	3
889	mPD-L1; 0,1 nM	Resultado de 869	3
890	hPD-L1; 0,02 nM	Resultado de 870	3
891	mPD-L1; 1,0 nM	Resultado de 870	3
892	mPD-L1; 0,1 nM	Resultado de 870	3
893	mPD-L1; 1,0 nM	Resultado de 872	3
894	mPD-L1; 0,1 nM	Resultado de 872	3

Se seleccionaron seis resultados de selección para el cribado, dos de la ronda 2 (no. 871 y 872) y cuatro de la ronda 3 (no. 887, 890, 891 y 894) usando el sistema de expresión de scFv soluble como se describe en la sección 1.3.1. Se cribó un total de 1.692 clones de scFv solubles para determinar la unión al antígeno inmovilizado en ELISA (antígeno hu-PD-L1-rCD4-His (SEQ ID NO: 79) recubierto a 3 µg/ml en PBS Dulbecco, 50 µl, en placas Maxisorb) usando el ensayo descrito en el Ejemplo 1.3.1 anterior usando solución de potenciación DELFIA.

De los 1.692 clones cribados, 1.029 clones produjeron una señal de más de 2.000 RFU en el ensayo DELFIA, dando una tasa de éxito de aproximadamente el 61 %. Los 736 clones superiores se seleccionaron y analizaron después usando un ensayo secundario (clasificación por afinidad) empleando tres concentraciones de antígeno hPD-L1-rCD4-His (1,0 nM, 0,2 nM y 0,04 nM). De los 736 clones cribados, los 48 clones que mostraron la mayor señal se seleccionaron para clonación y expresión en formato IgG1. Los clones se expresaron en células Expi293F™ (Fisher Scientific no. de cat. 13479756) a escala de 800 µl, y los sobrenadantes de cultivo se recogieron el 5º día después de la transfección para un cribado adicional en formato IgG1.

2.2 Cribado por SPR

Los 48 anticuerpos se clasificaron por afinidad usando SPR (instrumento Biacore T200). Para la clasificación, los sobrenadantes diluidos (1:10 en tampón de ejecución hecho de 1X PBS y Tween™-20 al 0,002 %) se inmovilizaron en un chip de Proteína A (GE healthcare, código de producto: 29127556) y se hizo fluir PD-L1-rCD4-His humano (SEQ ID NO: 79) sobre la superficie preparada a una concentración de 50 nM. Las constantes de velocidad de asociación (K_a) y disociación (K_d) generadas usando esta inyección única se usaron para determinar una constante de disociación estimada (K_D). Los valores de K_D de los clones se compararon con los del clon 280_02_G02_NS en formato IgG1 (G1/280_02_G02_NS). Se identificaron diez clones de secuencia única que mostraron mayor afinidad por PD-L1 humano que el clon G1/280_02_G02_NS y, por lo tanto, se sometieron a análisis cinético completo junto con el clon G1/280_02_G02_NS.

Brevemente, se realizaron experimentos de SPR usando un instrumento BiAcute T200. Los anticuerpos del sobrenadante de cultivo diluido se capturaron en un chip de Proteína A (GE Healthcare, 29127556) sobre FC2 a un caudal de 10 µl/min, con un tiempo de contacto de 60 segundos. Típicamente, esto dio como resultado

500-800 RU de anticuerpo capturado. Se inyectaron diluciones dobles de PD-L1-rCd4-His, que oscilaban de 50 a 0,05 nM, de 50 nM a un caudal de 30 μ l/min, (rango de concentración: 50 nM-0,05 nM) sobre FC1 y FC2. La asociación se midió durante 180 segundos, y la disociación se midió durante 300 segundos. Todas las mediciones se realizaron a 25 °C en PBS, pH 7,4, Tween™-20 al 0,05 %. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante sustracción de la celda de referencia y ajuste de los datos experimentales del sensograma asumiendo una interacción 1:1 usando el software BIAevaluation (GE, BR-1005-97). Los datos resultantes se ajustaron usando el software BIAevaluation y se calcularon los valores de k_a , k_d , y K_D correspondientes. De los diez clones ensayados, cuatro anticuerpos, designados "G1/887_04_E12", "894_08_A05", "G1/894_08_E05" y "G1/887_04_G12" presentaron valores de K_D subnanomolares, que eran inferiores a la K_D para G1/280_02_G02_NS. Los datos de afinidad obtenidos en las condiciones de cribado descritas mostraron que el barajado de cadenas ligeras kappa, descrito en el Ejemplo 2 permitió que la cadena pesada del anticuerpo G1/280_02_G02_NS se aparease no sólo con una cadena ligera lambda sino también con cadenas ligeras kappa para producir anticuerpos con una afinidad buena, y de hecho mejorada, por PD-L1 humano recombinante. Las afinidades precisas generadas con bajos niveles de mAb capturado se informan en la Tabla 3 Sección 3.2.

Ejemplo 3: Caracterización de clones kappa en formato IgG1

3.1 Ensayo de bloqueo de PD-1/PD-L1 basado en células

20 La capacidad de los clones anti-PD-L1 que contenían una cadena ligera kappa, G1/887_04_E12, G1/894_08_E05 y G1/887_04_G12, para bloquear la interacción entre PD1 y PD-L1 se evaluó en un ensayo bioluminiscente basado en células usando un producto de bioensayo de bloqueo de PD1/PD-L1 (Promega, J1250/J1255) según las recomendaciones del fabricante. La actividad bloqueante se comparó con el clon 25 G1/280_02_G02_NS.

30 Brevemente, todos los anticuerpos se expresaron y purificaron como se describe en la sección 1.3.3 y se ensayaron a diluciones de 3 veces de 100 nM a 35 pM (ocho concentraciones) por duplicado. Los valores calculados de Cl_{50} se muestran en la Tabla 3. Se mostró que todos los clones ensayados eran potentes inhibidores de la interacción PD1/PD-L1, con los tres clones que contenían la cadena ligera kappa G1/887_04_E12, G1/894_08_E05 y G1/884_04_G12 mostrando incluso mejores valores de Cl_{50} que el clon G1/280_02_G02_NS que contenía la cadena ligera lambda.

35 Tabla 3.

ID del clon	Cl_{50} (nM)
G1/280_02_G02_NS	0,51
G1/887_04_E12	0,35
G1/894_08_E05	0,36
G1/887_04_G12	0,33

3.2 Afinidades

40 La unión de los mAb anti-PD-L1 G1/887_04_E12, G1/887_04_G12 y G1/894_08_E05 a PD-L1-Avi-His humano biotinilado humano recombinante (Acro Biosystems, PD1-H82E5), PD-L1-His de cynomolgus (Acro Biosystems, PD1-C52H4) y PD-L1-His de ratón (Acro Biosystems, PD1-M5220) se midió después mediante SPR usando un instrumento Biacore T200 (GE Healthcare). Las afinidades se compararon con el clon 280_02_G02_NS en formato IgG1 (G1AA/280_02_G02_NS; el "AA" en este nombre de clon indica que este clon también contenía la mutación "LALA" en el dominio CH2).

45 Brevemente, los mAb anti-PD-L1, diluidos en tampón HBS-EP (GE Healthcare, BR100188) a 2 μ g/ml, se inyectaron individualmente en las celdas de flujo 2, 3 y 4 de un chip de Proteína A (GE Healthcare, 29127556) a 30 μ l/min para lograr una respuesta final de aproximadamente 110 RU. Los antígenos PD-L1-His recombinantes de ser humano, cynomolgus y ratón, diluidos en tampón HBS-EP, se inyectaron en la celda de flujo 1, 2, 3 o 4 según fuera apropiado en un rango de concentración de 81 nM a 0,037 nM con diluciones de 3 veces durante 4 min a 75 μ l/min y luego se dejaron disociar en tampón durante 10 min. La regeneración se logró inyectando glicina-HCl 10 mM pH 1,5 (GE Healthcare, Kit de captura de anticuerpos humanos, BR00356) durante 30 segundos a una velocidad de 30 μ l/min. Los datos sustraídos (celda de flujo 2 - celda de flujo 1, celda de flujo 3 - celda de flujo 1, o celda de flujo 4 - celda de flujo 1) se analizaron usando el software BIAevaluation 3.2 (GE Healthcare) para identificar la unión usando la unión del modelo 1:1 con transferencia de masa, con constante de índice de refracción (RI) 0. Para determinar las afinidades de las curvas de unión de PD-L1 de ratón, se usó la Rmáx de los perfiles de unión humanos correspondientes.

Los datos de unión demostraron que el clon G1AA/280_02_G02_NS y los clones G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 se unieron a PD-L1 humano y de cynomolgus con bajas afinidades nanomolares de un solo dígito o subnanomolares y presentaban reactividad cruzada completa humano/de cynomolgus (Tabla 4). En comparación con el clon G1AA/280_02_G02_NS, las afinidades de unión de los clones G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 fueron aproximadamente 1,8 a 4,8 veces mayores para PD-L1 humano y 2,7 a 4,7 veces mayores para PD-L1 de cynomolgus. Las afinidades de los clones por PD-L1 recombinante de ratón fueron menores, con valores de K_D que variaron de 38 a 225 nM, observándose la afinidad más elevada para el clon G1/887_04_E12. Estos datos muestran que la cadena pesada del anticuerpo G1AA/280_02_G02_NS puede emparejarse con cadenas ligeras lambda y kappa para producir anticuerpos con buenas afinidades (y en el caso de emparejamiento de cadenas ligeras kappa, subnanomolar) por PD-L1 recombinante humano y de cynomolgus, así como alguna, aunque menor, afinidad por PD-L1 recombinante de ratón.

Tabla 4.

15

Clon	PD-L1-His humano K_D (nM)	PD-L1-His de cynomolgus K_D (nM)	PD-L1-His de ratón K_D (nM)
G1AA/280_2_G02_NS	1,10	1,32	137
G1/894_08_E05	0,60	0,49	223
G1/887_04_E12	0,23	0,28	38
G1/887_04_G12	0,39	0,45	225

3.3 Unión de mAb anti-PD-L1 a PD-L1 expresado en células

3.3.1 Generación de células que sobreexpresan PD-L1 humano

20

Para evaluar la unión de los mAb anti-PD-L1 G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 a PD-L1 en la superficie celular, se generaron células HEK293 que sobreexpresaban PD-L1 humano.

25

La secuencia de PD-L1 humano (SEQ ID NO: 83) se subclonó en el vector pcDNA™5/FRT (ThermoFisher Scientific No. de Cat. V601020) usando sitios de restricción KpnI y NotI y el vector se transformó después en la línea celular Flp-In T-REx 293 (Life Technologies, R780-07) usando Lipofectamina 2000 (Life Technologies, 11668-019). Las células se cultivaron en DMEM que contenía FBS al 10 %, higromicina B 100 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, Z2475) y blasticidina 15 µg/ml (Melford Laboratories Ltd, B1105) durante 3-4 semanas hasta que se formaron colonias de células transformadas de manera estable. Estas colonias se amplificaron en presencia de doxiciclina 1 µg/ml (Sigma Aldrich, D9891) y se ensayaron para determinar la expresión de PD-L1 usando anticuerpo anti-PD-L1 humano conjugado con PE (MIH1) (BD Biosciences, 557924). Las células se despegaron usando tampón de disociación celular, se lavaron una vez con PBS, se sembraron en placas a 2×10^5 células en pocillos de una placa de 96 pocillos y después se incubaron con anticuerpo diluido 1:20 en PBS durante 1 hora a 4 °C, antes de lavarlas de nuevo en PBS y medirlas usando un citómetro Accuri C6 (BD Biosciences). Los datos se analizaron usando el software FlowJoX. La expresión de PD-L1 humano se detectó en la línea celular.

30

3.3.2 Ensayo de unión celular: la unión celular a HEK293-hPD-L1 y HEK-FRT de control muestra unión específica.

40

Los mAb anti-PD-L1 humano, G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 se ensayaron entonces para determinar la unión a células HEK293 que expresaban PD-L1 humano usando citometría de flujo. La unión no específica también se evaluó ensayando la unión a células parentales HEK293 que carecían de PD-L1 humano (línea celular Flp-In T-Rex 293, Life Technologies, R780-07).

45

Se prepararon suspensiones de HEK293 y HEK293.hPD-L1 en PBS que contenía BSA al 0,5 % (Sigma, A7906) y se sembraron a 1×10^5 célula/pocillo en 100 µl en placas de 96 pocillos de fondo redondo (VWR, 734-1797). Las células se lavaron una vez en 100 µl de DPBS 1x y los mAb G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 se diluyeron (1.10^{-6} -0,013 nM, diluciones de 5 veces) en 100 µl de DPBS 1x (Gibco, 14190-094). Las células lavadas se resuspendieron en la mezcla de anticuerpos diluida, se incubaron a 4 °C durante 30 minutos y después se lavaron una vez en PBS. Se añadieron entonces 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (IgG anti-humana de cabra Alexa Fluor 647-AffiniPure, específico del fragmento F(ab')2, Stratech Scientific, 109-605-006-JIR) diluido 1:1.000 en PBS, la mezcla de células/anticuerpo se incubó durante 20 minutos a 4 °C, y las células se lavaron entonces de nuevo con PBS y se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía 7AAD (1:1.000, Biotium, 40043) antes de analizarse usando un citómetro de flujo Canto II (BD

Bioscience). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de FITC (488 nm/530/30). Los valores de intensidad de fluorescencia media geométrica (GMFI) se representaron gráficamente frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación de log (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism.

5 Se encontró que los clones G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 se unían a PD-L1 humano en la superficie celular con valores de EC_{50} en el rango de 0,26 - 0,29 nM (véase la Tabla 5). No se observó unión a células HEK293 parentales lo que mostró la especificidad de la unión. Por lo tanto, todos los clones de mAb ensayados se unieron específicamente a PD-L1, sin observarse unión no específica.

10 Tabla 5.

Clon	HEK293:hPD-L1 EC_{50} (nM)	Células de control negativo HEK293-FRT
G1/894_08_E05	0,29	Sin unión
G1/887_04_E12	0,26	Sin unión
G1/887_04_G12	0,27	Sin unión

3.4 Actividad de mAb anti-PD-L1 en el ensayo de reacción mixta de linfocitos

15 La actividad de los mAb anti-PD-L1 se ensayó en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR). Un ensayo de MLR mide la respuesta inmune celular que se produce entre dos poblaciones de linfocitos alogénicos (la misma especie, pero genéticamente distinta). El ensayo usa células T CD4+ de un donante y células dendríticas derivadas de monocitos (iDC) de otro donante. Como las células inmunitarias contienen niveles fisiológicos de reguladores del punto de control inmunitario, el ensayo de MLR puede usarse para confirmar que la activación de las células T se potencia por el mAb en un sistema humano.

3.4.1 Generación de células T CD4+ expandidas

25 Se aislaron PBMC de conos de leucocitos mediante separación en gradiente de Ficoll. Se aislaron células T CD4+ usando un kit de aislamiento de células T CD4+ humanas (Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-533) según las instrucciones del fabricante. Se resuspendieron Dynabeads CD3/CD28 Activador-T humano (Life Technologies, 11131D) mediante agitación vortical. Las perlas se transfirieron a un tubo estéril de 15 ml y se añadieron 10 ml de RPMI (Life Technologies, 61870044) con FBS al 10 % (Life Technologies, 10270106) y 1x 30 penicilina estreptomicina (Life Technologies, 15140122) para lavar las Dynabeads. El sobrenadante se desechó. La cantidad requerida de células T CD4+ a $1,0 \times 10^6$ células/ml en RPMI con FBS al 10 % y 1x solución de penicilina-estreptomicina y 50 UI/ml de IL2 humana recombinante (Peprotech, 200-02-50 μ g) con una relación de perlas a células 3:1 se transfirió a un matraz T75 (Greiner Bio-one, 690195) y se incubaron a 37°C + CO₂ al 5 %. Despues de 3 días, las células se resuspendieron suavemente y se contaron. La densidad celular se mantuvo entre $0,8-1 \times 10^6$ células/ml añadiendo medio fresco (RPMI-FBS al 10 % + Solución de penicilina estreptomicina 1X + 50 UI/ml de rhIL2) según fuera necesario. El día 7 u 8, se retiraron las perlas CD3/28 y las células T CD4+ se dejaron reposar durante la noche a 1×10^6 células/ml de medio fresco RPMI-FBS al 10 % + Solución de penicilina estreptomicina 1X con 10 UI/ml de rhIL2 reducido. Las células se almacenaron congeladas hasta que se requirieron.

40 3.4.2 Generación de iDC

45 Se aislaron monocitos no tratados a partir de PBMC humanas usando un kit de aislamiento de monocitos generales humanos, (Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-537) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los monocitos se diferenciaron en iDC usando medio de diferenciación Mo-DC humano (Miltenyi Biotec Ltd, 130-094-812) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.3 Ensayo MLR

50 Las células T expandidas se descongelaron un día antes del experimento, se lavaron con medio AIM V (Gibco, 12055-091) y se incubaron a 37°C, CO₂ al 5 % en medio AIM V durante la noche. Los mAb anti-PD-L1 humano, G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 se diluyeron a 4x la concentración final por triplicado en 50 μ l de medio AIM V en placas de fondo redondo de 96 pocillos (VWR, 734-1797). Un anticuerpo anti-FITC, designado 4420 (Bedzyk et al., 1989; Bedzyk et al., 1990), que contenía la mutación LALA se incluyó como control negativo. Se ensayó una serie de diluciones de 3 veces partiendo de 30 nM a 0,002 nM. Se añadieron tanto 1×10^4 células iDC suspendidas en 50 μ l de medio AIM V como 1×10^5 células T CD4+ expandidas suspendidas en 100 μ l de medio AIM V a las diluciones de anticuerpo y se incubaron durante 5 días a 37°C + CO₂ al 5 %. Se incluyeron los siguientes controles: células T CD4+ solas, iDC solas, células T CD4+ + iDC y

5 medio AIM V solo. Se recogieron los sobrenadantes, se diluyeron las muestras (1:25) y se midieron las concentraciones de interferón gamma (IFN- γ) usando el kit de ELISA de IFN gamma humano Ready-SET-Go! (Life Technologies, 88-7316-77). Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de placas con el software Gen5, BioTek. Los valores de absorbancia de 630 nm se restaron de los de 450 nm (Corrección). La curva estándar para el cálculo de la concentración de citocinas se basó en un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (Software Gen5, BioTek). La concentración de IFN- γ humano se representó gráficamente frente al logaritmo de la concentración de anticuerpo y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación de logaritmo (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism.

10 10 Los mAb anti-PD-L1 humano, G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12, mostraron una potente actividad en el ensayo de MLR con valores de CE_{50} inferiores a 0,030 nM y un nivel máximo de IFN- γ ($E_{máx}$) de más de 10.000 pg/ml (Tabla 6, representativa de la Figura 1). La CE_{50} indica la concentración de mAb a la que se alcanza la mitad de la respuesta, mientras que $E_{máx}$ es un valor absoluto que indica la concentración máxima de IFN- γ conseguida en el ensayo. No se observó actividad con el mAb G1AA/4420 de control negativo, como

15 se esperaba.

Tabla 6.

Clon	Actividad funcional en el ensayo de MLR	
	CE_{50} (nM)	$E_{máx}$ (pg/ml)
G1/894_08_E05	0,024	14.620
G1/887_04_E12	0,029	11.440
G1/887_04_G12	0,021	12.670
Control negativo G1AA/4420	Sin actividad	

20 20 3.5 Actividad de mAb anti-PD-L1 en un ensayo de activación de células T DO11.10 de ratón

Como los mAb anti-PD-L1 humano G1/887_04_E12, G1/887_04_G12 y G1/894_08_E05 mostraron tener una reacción cruzada débil con PD-L1 de ratón (véase el Ejemplo 3.2, Tabla 4) su actividad funcional hacia PD-L1 de ratón se examinó en un ensayo de liberación de interleucina-2 (IL-2) basado en las líneas celulares de hibridoma de linfocitos T DO11.10 OVA y linfocitos B LK35.2. La liberación de IL-2 es un marcador de la activación de las células T. Las células T que expresaban PD-1 murino endógeno se transfecaron con vector vacío (pLVX). Las células B se transfecaron con una construcción de PD-L1 de ratón.

30 3.5.1 Producción de líneas de células T con un vector vacío

Se usó la metodología de transducción lentiviral para generar células DO11.10 (National Jewish Health) que contenían el vector lentiviral vacío pLVX usando el Sistema de Empaquetamiento Lenti-X HTX (Clontech, 631249). El vector de expresión Lenti-X (pLVX) (Clontech, 631253) se cotransfectó con una mezcla de empaquetamiento Lenti-X HTX en la línea celular Lenti-X 293T (Clontech, 632180) para generar virus. La línea celular DO11.10 se transdujo usando las partículas lentivirales producidas con el sistema de empaquetamiento Lenti-X HTX.

35 3.5.2 Producción de células presentadoras de antígeno que sobreexpresaban PD-L1
Se usó la metodología de transducción lentiviral para generar células de linfoma de células B LK35.2 (ATCC, HB-98) que sobreexpresan PD-L1 de ratón usando el Sistema de Empaquetamiento Lenti-X HTX (Clontech, 631249). El vector de expresión Lenti-X (pLVX) (Clontech, 631253) que contenía ADNC de PD-L1 de ratón (que codificaba el PD-L1 de ratón de la SEQ ID NO: 84) se cotransfectó con una mezcla de empaquetamiento Lenti-X HTX en la línea celular Lenti-X 293T (Clontech, 632180) para generar virus. La línea celular LK35.2 se transdujo usando los vectores lentivirales producidos con el sistema de empaquetamiento Lenti-X HTX.

40 40 3.5.3.3 Ensayo de activación de células T DO11.10 de ratón

50 50 Se prepararon diluciones de los mAb anti-PD-L1 G1/887_04_E12, G1/887_04_G12 y G1/894_08_E05 o el mAb de control negativo anti-FITC (G1AA/4420) en medios experimentales (DMEM (Gibco, 61965-026), FBS al 10 % (Gibco, 10270-106), piruvato de sodio 1 mM (Gibco, 11360-070)). Los mAb se mezclaron 1:1 con 4×10^5 /ml de células LK35.2 mPD-L1 en medio experimental en presencia de péptido OVA 2,46 μ M (H-ISQAVHAAEINEAGR-OH, Pepscan) (100 μ L de células LK35.2 mPD-L1 (mezcla de hibridoma de células B transducido con un vector lentiviral que contiene mPD-L1 para sobreexpresar PD-L1 de ratón)/mAb por pocillo en placa de fondo redondo de 96) y se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 1 hora. Se añadieron 2×10^5 células pLVX DO11.10 (hibridoma de células T DO11.10 transducidas con un vector lentiviral vacío) por ml en un volumen de 100 μ l de medio experimental a 100 μ l de la mezcla de LK35.2 mPD-L1/(mAb). Las células se

- mezclaron después antes de incubarlas a 37°C, CO₂ al 5 % durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se ensayaron con el kit de ELISA para IL-2 de ratón (eBioscience, 88-7024-88 o R&D systems, SM2000) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de placas con el software Gen5, BioTek. Los valores de absorbancia de 570 nm se restaron de los de 450 nm (Corrección). La curva estándar para el cálculo de la concentración de citocinas se basó en un ajuste de curva logística de cuatro parámetros (Software Gen5, BioTek). La concentración de IL-2 de ratón se representó gráficamente frente al logaritmo de la concentración de mAb y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación de logaritmo (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism.
- Los resultados se muestran en la Figura 2 y la Tabla 7. Los mAb anti-PD-L1 humano mostraron actividad significativa en el ensayo de activación de células T de ratón con potencias (CE₅₀) en el rango de 1-4,4 nM. No se observó actividad con el mAb de control negativo como se esperaba. De los tres clones ensayados, G1/887_04_E12, que mostró la afinidad más alta por PD-L1 recombinante de ratón (véase la Tabla 4), también fue el clón más potente en el ensayo de activación de células T. Las diferencias en la potencia fueron menores que las afinidades medidas, lo que probablemente se debe a la alta sobreexpresión de PD-L1 de ratón en las células LK35.2 en este ensayo.

Tabla 7

Clon	Actividad funcional en el ensayo de activación de células T DO11.10 mPD-L1	
	CE ₅₀ (nM)	E _{máx} (pg/ml)
G1/894_08_E05	4,37	2.112
G1/887_04_E12	1,02	1.966
G1/887_04_G12	2,71	1.912
Control negativo G1AA/4420	Sin actividad	

3.6 Farmacocinética en ratones sin tratamiento previo

Para investigar la farmacocinética *in vivo* (PK), los mAb anti-PD-L1 G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 se ensayaron en un estudio PK de grado de investigación en donde los mAb se administraron a ratones que no portaban tumores y se midieron las concentraciones en el suero sanguíneo a lo largo del tiempo.

Se dividieron ratones C57/BL6 (hembras de 9-10 semanas de edad) en 4 grupos de 3 animales para recibir una dosis única del anticuerpo de ensayo administrado por vía intravenosa. Los animales se dosificaron una vez con los mAb anti-PD-L1 a 8 mg/kg. Los anticuerpos se administraron por vía intravenosa (100 µl, vena de la cola) y después se recogieron muestras de sangre (20 µl, vena de la cola) en 7 puntos de tiempo diferentes, de 3 ratones por punto de tiempo. Los puntos de tiempo fueron 0,5, 1, 6, 24, 48, 96 y 144 horas después de la dosificación. Se dejó coagular la sangre a temperatura ambiente durante 2 horas, se centrifugó en una centrífuga a 2.000 g durante 20 min, luego se recuperó el suero y se almacenó a -80 °C. Para el análisis, todas las muestras de suero se descongelaron y se analizaron al mismo tiempo en una máquina Gyrolab xPlore (Gyrolab Technologies) usando el programa 200-3W-002-A. Se usó IgG antihumana de cabra biotinilada-cadena pesada y ligera adsorbida en mono (Cambridge Bioscience, A80-319B) como reactivo de captura e IgG antihumana de cabra-AF647 (Cambridge Bioscience, 2040-31) como reactivo de detección. La concentración de IgG humana se midió en cada muestra de suero y la concentración de fármaco real se calculó basándose en las curvas de titulación para cada compuesto para eliminar las diferencias potenciales en la detección. Se realizaron curvas estándar adicionales para validar que la unión al mAb IgG anti-humano de captura o detección no se alteraba por los mAb.

Los mAb anti-PD-L1 no mostraron una eliminación rápida inicial y los niveles de exposición se mantuvieron a más de 24 µg/ml durante el periodo de 6 días (Figura 3). Estos datos son como se esperaba para los mAb y están en línea con los datos publicados de mAb anti-PD-L1 (Deng et al., 2016).

3.7 Resumen de la caracterización de clones kappa en formato IgG1

Los mAb anti-PD-L1 G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12, que contenían las cadenas ligeras kappa seleccionadas demostraron reactividad cruzada con PD-L1 de cynomolgus y ratón, mostraron unión específica a PD-L1 expresado en la superficie celular, y mostraron una afinidad incluso mayor por PD-L1 recombinante humano y de cynomolgus que el clón G1/280_02_G02 que contenía la cadena ligera lambda. Se mostró que los mAb anti-PD-L1 G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12 eran potentes activadores de las células T humanas *in vitro*, que tenían reactividad cruzada funcional en ratones, y que tenían perfiles PK satisfactorios en ratones que no portan tumor.

Ejemplo 4: Optimización de secuencias

4.1 Identificación y eliminación de sitios de desamidación de proteínas potenciales

5 El análisis de la secuencia del clon G1/280_02_G02_NS dio como resultado la identificación de la secuencia NSNT (SEQ ID NO: 6) en el bucle H-CDR2 (en las posiciones 54-57 de Kabat) como un sitio de desamidación potencial, que, si se desamida, podría afectar a la unión. La cadena pesada de este clon se retuvo en todos los clones que contenían la cadena ligera kappa obtenidos mediante la campaña de barajado de cadenas descrita en el Ejemplo 2, de modo que este sitio de desamidación potencial también estaba presente en los clones 10 G1/887_04_E12, G1/894_08_A05, G1/894_08_E05 y G1/887_4_G12. Usando cebadores específicos más cercanos a la secuencia de la línea germinal, la secuencia de NSNT (SEQ ID NO: 6) se cambió en los cuatro clones que contenían la cadena ligera kappa mediante mutagénesis dirigida a sitio bien a GGST (SEQ ID NO: 7), SGGT (SEQ ID NO: 5) o SGNA (SEQ ID NO: 8) para producir los clones variantes identificados en la Tabla 15 8. Al mismo tiempo que se eliminó este sitio de desamidación potencial, también se investigó el papel del residuo de prolina en la posición 28 de Kabat en la región VH del clon G1/887_04_E12, que se introdujo involuntariamente en la secuencia de este anticuerpo durante el barajado de la cadena ligera kappa, revirtiéndolo de nuevo a un residuo de treonina tal como está contenido en el clon G1/280_02_G02_NS. El clon parental y variante resultante (todos en formato IgG1) se transfecaron a una escala de 0,8 ml, y los sobrenadantes de cultivo recogidos cinco días después de las transfecciones se usaron para determinar las 20 afinidades de los clones por PD-L1-rCD4-His humano y de cynomolgus por SPR. Se generó PD-L1-rCD4-His de cyno como se describe en el Ejemplo 1.1. Con la excepción de los clones variantes derivados del clon G1/887_04_E12, todos los clones variantes retuvieron sus afinidades subnanomolares por PD-L1 humano y de cynomolgus en comparación con su clon parental respectivo (véase la Tabla 8).

25 Tabla 8.

ID del clon	H-CDR2 (posición 54-57) resto "NSNT" o línea germinal (GGST, SGGT o SGNA)	H-CDR1 Prolina (posición 28)	hPDL1 K _D (nM)	cPDL1 K _D (nM)
G1/280_02_G02_NS	-	-	1,20	1,80
G1/887_04_E12 (Parental)	NSNT (SEQ ID NO: 6)	+	0,21	0,25
G1/929_01_A01	GGST (SEQ ID NO: 7)	-	2,66	3,18
G1/929_01_A02	SGGT (SEQ ID NO: 5)	-	3,07	3,64
G1/929_01_A03	SGNA (SEQ ID NO: 8)	-	2,66	3,31
G1/894_08_A05 (Parental)	NSNT (SEQ ID NO: 6)	-	0,42	0,57
G1/929_01_A04	GGST (SEQ ID NO: 7)	-	0,47	0,60
G1/929_01_A05	SGGT (SEQ ID NO: 5)	-	0,55	0,62
G1/929_01_A06	SGNA (SEQ ID NO: 8)	-	0,45	0,58
G1/894_08_E05 (Parental)	NSNT (SEQ ID NO: 6)	-	0,48	0,59
G1/929_01_A07	GGST (SEQ ID NO: 7)	-	0,47	0,59
G1/929_01_A08	SGGT (SEQ ID NO: 5)	-	0,50	0,65
G1/929_01_A09	SGNA (SEQ ID NO: 8)	-	0,49	0,57
G1/887_04_G12 (Parental)	NSNT (SEQ ID NO: 6)	-	0,36	0,50
G1/929_01_A10	GGST (SEQ ID NO: 7)	-	0,42	0,60
G1/929_01_A11	SGGT (SEQ ID NO: 5)	-	0,51	0,57
G1/929_01_A12	SGNA (SEQ ID NO: 8)	-	0,51	0,66

30 Las afinidades muy reducidas de los clones G1/929_01_A01, G1/929_01_A02 y G1/929_01_A03 en comparación con su parental (G1/887_04_E12) se consideraron probablemente debidas a la eliminación de la prolina en la región VH en la posición 28 de Kabat en lugar de a la presencia de las sustituciones GGST (SEQ ID NO: 7), SGGT (SEQ ID NO: 5) y SGNA (SEQ ID NO: 8) en H-CDR2. Fue sorprendente que este residuo de

prolina en el clon G1/887_04_E12 parecía ser importante por su afinidad por PD-L1. Las variantes derivadas de los tres clones parentales G1/887_04_E12, G1/894_08_E05 y G1/887_04_G12 que contenían la sustitución SGGT (SEQ ID NO: 5) en su H-CDR2 (posiciones 54-57), concretamente los clones G1/929_01_A02, G1/929_01_A08 y G1/929_01_A11, se seleccionaron para una caracterización adicional basándose en que esta sustitución SGGT (SEQ ID NO: 5) estaba más próxima a la secuencia de la línea germinal.

Usando mutagénesis dirigida a sitio, el sitio de desamidación potencial (NSNT (SEQ ID NO: 6) en la posición 54 a 57 de Kabat) en el bucle H-CDR2 del clon G1/280_02_G02_NS también se modificó a SGGT (SEQ ID NO: 5). Adicionalmente, un sitio de desamidación potencial adicional (resto NS) identificado en las posiciones 31 a 32 de Kabat en la CDR1 de la cadena ligera lambda de este clon se modificó a NY mutando la serina 32 (numeración de Kabat) a una tirosina, ya que se encuentra tirosina en esta posición en varias secuencias de la línea germinal, tales como IGLV2-8-01, IGLV2-8-02, IGLV2-8-03, IGLV2-11-01, IGLV2-11-02, IGLV2-11-03 e IGLV2-14-01, IGLV2-14-02, IGLV2-14-03, IGLV2-14-04. La combinación de estas modificaciones produjo el clon G1/lambdav3 que contenía la cadena ligera lambda, que también se seleccionó para una caracterización adicional.

15 Ejemplo 5: Caracterización de los mAb/mAb²

5.1 Clonación y producción de clones en formato mAb y mAb²

20 El residuo de treonina en la posición 28 de Kabat en la región VH del clon variante de "SGGT" G1/929_01_A02 identificado en el Ejemplo 4 se mutó a una prolina, como está presente en la misma posición en su clon parental G1/887_04_E12, con el fin de mejorar su afinidad por PD-L1 humano y de cynomolgus. Se usó la expresión transitoria en células HEK293-6E y la purificación usando columnas de proteína A mAb Select SuRe para producir este clon variante modificado y los otros tres clones variantes "SGGT" (G1/929_01_A08, G1/929_01_A11 y G1/lambdav3) identificados en el Ejemplo 4 en formato IgG1 y con la mutación LALA para permitir el ensayo de su actividad funcional en ausencia de función efectora. Los mAb resultantes se designaron G1AA/E12v2, G1AA/E05v2, G1AA/G12v2 y G1AA/lambdav3. Las secuencias de cadena pesada y ligera se muestran respectivamente en la SEQ ID NO: 47 y la SEQ ID NO: 48 para G1AA/E12v2; la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 50 para G1AA/G12v2; la SEQ ID NO: 51 y la SEQ ID NO: 52 para G1AA/E05v2 y la SEQ ID NO: 61 y la SEQ ID NO: 62 para G1AA/lambdav3.

25 Los sitios de unión a antígeno basados en CDR de un mAb pueden combinarse con restos Fcab (unión a antígeno por fragmento cristalizable) generados en un dominio constante para proporcionar anticuerpos biespecíficos denominados mAb².

30 Los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se produjeron en formato mAb² anti-CD137/anti-PD-L1 para ensayar su especificidad por PD-L1 humano. Los mAb² se produjeron en formato IgG1 LALA, teniendo la cadena pesada un sitio de unión anti-CD137 humano en el dominio CH3 del resto Fcab y un dominio VH del clon de mAb anti-PD-L1 G1AA/E12v2, G1AA/E05v2, G1AA/G12v2 o G1AA/lambdav3. Para generar los mAb², las cadenas pesadas se cotransfектaron con la cadena ligera correspondiente de los mAb anti-PD-L1. Los mAb² se produjeron mediante expresión transitoria en células HEK293-6E y se purificaron usando columnas de proteína A mAb Select SuRe para producir los clones FS22-172-003AA/E12v2, FS22-172-003AA/G12v2, FS22-172-003AA/E05v2 y FS22-172-003AA/lambdav3. Las secuencias de cadena pesada y ligera se muestran respectivamente en la SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 86 para FS22-172-003AA/E12v2, la SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88 para FS22-172-003AA/G12v2, la SEQ ID NO: 89 y SEQ ID NO: 90 para FS22-172-003AA/E05v2, y la SEQ ID NO: 91 y SEQ ID NO: 92 para FS22-172-003AA/lambdav3.

35 5.2 Afinidades de mAb por PD-L1 humano y de cynomolgus

40 Para determinar si las modificaciones de secuencia adicionales presentes en G1AA/lambdav3 (concretamente, NSNT (SEQ ID NO: 6) a SGGT (SEQ ID NO: 5) en la VH-CDR2, NS a NY en la VL-CDR1 y la mutación LALA) y los mAb que contenían la cadena ligera kappa G1AA/E12v2, G1AA/E05v2 y G1AA/G12v2 (concretamente, la mutación LALA y, en G1AA/E12v2 únicamente, treonina a prolina en la posición 28 de Kabat en la región VH) tenían afectadas las cinéticas de unión, se determinaron las afinidades de estos mAb anti-PD-L1 por PD-L1 humano y de cynomolgus como se describe en el Ejemplo 3.2. Los mAb G1AA/lambdav3, G1AA/E05v2, G1AA/E12v2 y G1AA/G12v2 exhibieron afinidades por PD-L1 humano y de cynomolgus similares a las observadas en el Ejemplo 3.2 (Tabla 4) para los mAb G1AA/280_02_G02_NS G1/894_08_E05, G1/887_04_E12 y G1/887_04_G12, lo que demuestra que las afinidades de unión de los mAb y mAb² ensayados no se vieron afectadas por la modificación de los sitios de desamidación potenciales o la introducción de la mutación LALA. El mAb G1AA/E12v2 mostró el valor de K_D más bajo de los cuatro mAb ensayados (0,21 nM para PD-L1 humano, y 0,37 nM para PD-L1 de cynomolgus).

45 El VH de G1AA/E12v2 difiere del de G1/929_01_A02 (Ejemplo 4, Tabla 8) en un residuo; G1AA/E12v2 tiene una prolina en la posición 28 de Kabat mientras que G1/929_01_A02 tiene una treonina en esta posición. G1/929_01_A02 tenía una afinidad más de 10 veces menor por PD-L1 tanto humano como de cynomolgus en comparación con G1AA/E12v2; estos datos demuestran la importancia del residuo de prolina en la posición 28

(nomenclatura de Kabat) en el VH del clon G1AA/E12v2 para su afinidad por PD-L1 humano y de cynomolgus.

Tabla 9.

mAb	PD-L1-His humano	PD-L1-His de cuyo
	K _D (nM)	K _D (nM)
G1AA/lambda v3	1,34	2,45
G1AA/E05v2	0,50	0,89
G1AA/E12v2	0,21	0,37
G1AA/G12v2	0,44	0,75

5

5.3 Especificidad para los miembros de la familia PD-L1

PD-L1 pertenece a la familia de homología B7 de reguladores del punto de control inmunitario (Ni y Dong, 2017). Para analizar la especificidad de los brazos Fab anti-PD-L1 de los clones de mAb² FS22-172-003AA/lambda v3, FS22-172-003AA/E05v2, FS22-172-003AA/E12v2 y FS22-172-003AA/G12v2, se ensayó su capacidad para unirse a miembros de la familia estrechamente relacionados usando SPR. El objetivo fue demostrar la especificidad al mostrar ausencia de unión del mAb² a antígenos estrechamente relacionados a una concentración de 1 μM, pero al mostrar unión a receptores PD-L1 a una concentración de 1 nM.

10 Las celdas de flujo en chips CM5 se inmovilizaron con aproximadamente 1.000 RU de PD-L2-Fc humano (R&D Biosystems, 1224-PL), CD80-Fc (R&D Biosystems, 140-B1), PD-1-His (R&D Biosystems, 8986-PD), B7-H3-His (producción interna de F-star), PD-L1-Fc (R&D Biosystems, 156-B7) o PD-L1-His (Acrobiosystems PD1-H83F3). La celda de flujo 1 se hizo funcionar como una inmovilización en blanco. Los mAb² se diluyeron a 1 μM y 1 nM en tampón 1x HBS-EP (GE Healthcare, código de producto BR100188), se dejó fluir sobre el chip durante 3 min y después se dejó disociar durante 4 min. Se usó una inyección de 30 segundos de glicina 10 mM pH 1,5 para la regeneración. Se injectaron mAb de control positivo a 50-100 nM para demostrar el recubrimiento de cada antígeno. Los niveles de unión se determinaron al final de la fase de asociación y se compararon.

15 Todos los clones de mAb² ensayados mostraron un alto nivel de especificidad, con menos de 10 RU de unión del mAb² a los cuatro antígenos detectados a 1 μM en comparación con un rango de 105 a 570 RU de respuesta de unión detectada a 1 nM para unión a PD-L1-Fc o PD-L1-His humanos. Estos resultados mostraron que la especificidad de los brazos Fab por PD-L1 se retuvo independientemente de las modificaciones hechas a las CDR para eliminar sitios de desamidación potenciales, y que la introducción de la mutación LALA y la producción de los Fab en formato mAb² no afectó su unión a PD-L1.

20

5.4 Actividad de los mAb anti-PD-L1 humano en MLR

25 Los mAb anti-PD-L1, G1AA/E05v2, G1AA/E12v2 y G1AA/G05v2 se ensayaron en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) como se describe en el Ejemplo 3.4. Se usó G1AA/4420 como control negativo. Los datos se muestran en la Tabla 10 y la Figura 4. Los mAb G1AA/E05v2, G1AA/E12v2 y G1AA/G12v2 mostraron una potente actividad en el ensayo de MLR con valores de CE₅₀ inferiores a 0,054 nM y un nivel máximo de IFN-γ (Emáx) superior a 600 pg/ml (Tabla 10, Figura 4). Los valores de CE₅₀ y especialmente los de Emáx fueron significativamente diferentes de los descritos en el Ejemplo 3.4. Se cree que esta diferencia se debe a la variabilidad del donante, ya que la respuesta depende de la reacción alogénica entre las células T de un donante y las células dendríticas derivadas de monocitos de otro donante. La potencia de los mAb anti-PD-L1 humano era consistente con los datos descritos en el Ejemplo 3.4, como lo era la clasificación de los clones por orden de potencia. No se observó actividad para el mAb G1AA/4420 de control negativo, como se esperaba.

30

Tabla 10.

35

Actividad funcional en el ensayo MLR		
Clon	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (pg/ml)
G1AA/E05v2	0,047	632
G1AA/E12v2	0,054	666
G1AA/G12v2	0,040	686
Control negativo G1AA/4420	Sin actividad	

5.5 Expresión, purificación y caracterización analítica de los mAb anti-PD-L1

Los mAb G1AA/E05v2, G1AA/E12v2 y G1AA/G12v2 se produjeron a escala de laboratorio y se caracterizaron por los métodos analíticos estándar de SEC y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

5.5.1 Expresión y purificación a escala de laboratorio de los mAb anti-PD-L1

Las secuencias de ADN que codificaban los mAb G1AA/E05v2, G1AA/E12v2 y G1AA/G12v2 se transfecaron en células HEK293 6E (National Research Council Canadá) usando PEElpro (Polyplus, Francia). Despues de 5 días, se recogieron los fluidos del cultivo celular y se purificaron en columnas preempaquetadas de Proteína A MabSelect usando un instrumento AKTAXpress (ambos de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). El equilibrado de las columnas se llevó a cabo en Tris 50 mM, NaCl 250 mM a pH 7,0 seguido de la carga con fluido de cultivo celular recogido. La resina se lavó usando Tris 50 mM, NaCl 250 mM a pH 7,0 y esto fue seguido por la elución del mAb usando tampón a pH menor de 3,5.

5.5.2 Análisis por SE-UPLC

Se realizó SE-UPLC después de la purificación dentro de las 24 horas posteriores a la purificación (el material se almacenó a 4 °C) usando un Acquity H-Class Bio UPLC (Waters Corp. Reino Unido) para medir el porcentaje de monómero. Se usó una columna Acquity UPLC BEH200 SEC 1,7 mm (4,6 x 150 mm), la fase móvil consistió en fosfato de sodio 250 mM, L-arginina 100 mM a pH 6,8. La cuantificación de especies monoméricas, de bajo peso molecular y de alto peso molecular se realizó usando el software Empower (Waters Corp, Reino Unido).

5.5.3 Termoestabilidad

La temperatura de fusión (T_m) de G1AA/E05v2, G1AA/E12v2 y G1AA/G12v2 se midió usando un calorímetro diferencial de barrido capilar Microcal VP (DSC). Se incluyó G1AA/lambdav3 para evaluar la diferencia entre los mAb que contenían la cadena ligera kappa y lambda. Las muestras se midieron en tampón de muestra a una concentración de 0,2 mg/ml. La velocidad de escaneo se ajustó a 60 °C/h y los datos se recogieron entre 35 °C y 100 °C. El análisis de los datos se realizó con el software Origin 7.0. Como los picos de DSC de Fab y CH3 se superponían, se notificó un valor.

Tabla 11.

mAb	Pureza de monómero después de Proteína A %	Tm de Fab/CH3
G1AA/E05v2	99,48 ± 0,01 %	80,4-82,8 °C
G1AA/E12v2	98,85 ± 0,07 %	81,4-84,1 °C
G1AA/G12v2	99,83 ± 0,11 %	78,1-81,3 °C
G1AA/lambdav3	99,75 ± 0,25 %	68,1 °C

Un resumen de los resultados se muestra en la Tabla 11. Los tres mAb: G1AA/E05v2, G1AA/E12v2 y G1AA/G12v2 mostraron parámetros de caracterización analítica favorables; la pureza del monómero después de Proteína A fue mayor del 98 % y se encontró que la estabilidad térmica de la transición Fab (T_m) estaba en el extremo superior de las transiciones notificadas típicamente para IgG1, con G1AA/E12v2 pareciendo ser el más estable térmicamente (Fab/CH3 $T_m = 81,4-84,1$ °C). El mAb de cadena ligera lambda, G1AA/lambdav3, tenía una T_m más baja que los tres mAb que contenían la cadena ligera kappa.

Referencias

Bedzyk WD, Johnson LS, Riordan GS, Voss EW Jr. Comparison of variable region primary structures within an anti-fluorescein idiotype family. *J. Biol. Chem.* 264(3), 1565-69 (1989).

Bedzyk WD, Weidner KM, Denzin LK, Johnson LS, Hardman KD, Pantoliano MW, Asel ED, Voss EW Jr. Immunological and structural characterization of a high affinity anti-fluorescein single-chain antibody. *J. Biol. Chem.* 265(30), 18615-20 (1990).

Brown MH, Barclay AN. Expression of immunoglobulin and scavenger receptor superfamily domains as chimeric proteins with domains 3 and 4 of CD4 for ligand analysis. *Protein Eng.* 7(4), 515-21 (1994).

Bruhns P, Iannscoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113(16), 3716-25 (2009).

- Callahan MK, Postow, MA, Wolchok JD. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity* 44, 1069-1078 (2016).
- Chapple SD, Crofts AM, Shadbolt SP, McCafferty J, Dyson MR. Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 6: 49 (2006).
- Chatterjee S, Lesniak WG, Nimmagadda S. Noninvasive Imaging of Immune Checkpoint Ligand PD-L1 in Tumors and Metastasis for Guided Immunotherapy. *Mol. Imaging* 16, 1-5 (2017).
- Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(9), 4275-80 (2010).
- Deng R, Burbaca D, Pastuskovas CV, Boswell CA, West D, Cowan KJ, Chiu H, McBride J, Johnson C, Xin Y, Koeppen H, Leabman M e Iyer S. Preclinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue distribution, and tumor penetration of anti-PD-L1 monoclonal antibody, an immune checkpoint inhibitor. *MAbs* 8(3), 593-603 (2016).
- Dyson MR, Zheng Y, Zhang C, Colwill K, Pershad K, Kay BK, Pawson T, McCafferty J: Mapping protein interactions by combining antibody affinity maturation and mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 417(1), 25-35 (2011).
- Grosso J, Inzunza D, Wu Q, Simon J, Singh P, Zhang X, Phillips T, Simmons P, Cogswell J. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in various tumor types. *J. Immunother. Cancer.* 1 (Supl 1), 53 (2013).
- Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrin A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515(7528), 563-7 (2014).
- Hezareh M, Hessell AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW. Efector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75(24), 12161-8 (2001).
- Hu S, Shively L, Raubitschek A, Sherman M, Williams LE, Wong JY, Shively JE, Wu AM. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 56(13), 3055-61 (1996).
- Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, Totpal K, Wong PY, Ultsch M, Meng YG, Mulkerrin MG. Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol.* 164(8), 4178-84 (2000).
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(19), 1293-7 (2002).
- Jain T, Sun T, Durand S, Hall A, Houston NR, Nett JH, Sharkey B, Bobrowicz B, Cafry I, Yu Y, Cao Y, Lynaugh H, Brown M, Baruah H, Gray LT, Krauland EM, Xu Y, Vasquez M y Wittrup KD. Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape. *PNAS* 114 (5), 944-949 (2017).
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed. Publicación NIH No. 91-3242. Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services (1991).
- Kontermann RE. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *MAbs* 4(2), 182-97 (2012).
- Klein C, Schaefer W, Regula JT. The use of CrossMAb technology for the generation of bi- and multispecific antibodies. *MAbs*. 8(6), 1010-20 (2016).
- Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 373(13), 1270-1 (2015).
- Lefranc MP, Pommié C, Kaas Q, Duprat E, Bosc N, Guiraudou D, Jean C, Ruiz M, Da Piédade I, Rouard M, Foulquier E, Thouvenin V, Lefranc G. IMGT unique numeration for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 29(3), 185-203 (2005).
- Lobner E, Humm A, Mlynář G, Kubinger K, Kitzmüller M, Traxlmayr MW, Djinović-Carugo K, Obinger C. Two-faced Fcαb prevents polymerization with VEGF and reveals thermodynamics and the 2.15 Å crystal structure of the complex. *MAbs* 9(7), 1088-1104 (2017).

- Martin CD, Rojas G, Mitchell JN, Vincent KJ, Wu J, McCafferty J, Schofield DJ. A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. *BMC Biotechnol.* 6, 46 (2006).
- Ni L, Dong C. New B7 family checkpoints in human cancers. *Mol. Cancer Ther.* 16(7), 1203-11 (2017).
- Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, Bellmunt J, Burris HA, Petrylak DP, Teng SL, Shen X, Boyd Z, Hegde PS, Chen DS, Vogelzang NJ. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 515(7528), 558-62 (2014).
- Rao M, Valentini D, Dodoo E, Zumla A, Maeurer M. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. *Int. J. Infect. Dis.* 56, 221-228 (2017).
- Schlothauer T, Herter S, Koller CF, Grau-Richards S, Steinhart V, Spick C, Kubbies M, Klein C, Umaña P, Mössner E. Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions. *Protein Eng. Des. Sel.* 29(10), 457-466 (2016).
- Schofield DJ, Pope AR, Clementel V, Bucell J, Chapple SDj, Clarke KF, Conquer JS, Crofts AM, Crowther SR, Dyson MR, Flack G, Griffin GJ, Hooks Y, Howat WJ, Kolb-Kokocinski A, Kunze S, Martin CD, Maslen GL, Mitchell JN, O'Sullivan M, Perera RL, Roake W, Shadbolt SP, Vincent KJ, Warford A, Wilson WE, Xie J, Young JL, McCafferty J. Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. *Genome Biol.* 8(11), R254 (2007).
- Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Mol. Immunol.* 67(2 Pt A), 95-106 (2015).
- Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41(1), 207-34 (2005).
- Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell.* 9(1), 63-73 (2018).
- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizavi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* 369(2), 122-33 (2013).
- Wykes MN, Lewin SR. Immune checkpoint blockade in infectious diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 18(2), 91-104 (2017).
- Información de listado de secuencias**
- Secuencias de anticuerpos**
- Notas:
- i. El dominio variable, de cadena pesada completa se muestra en cursiva, las CDR según el esquema de Kabat se muestran en cursiva y subrayadas, las CDR según el esquema de IMGT se muestran en cursiva en negrita, por lo tanto, cualquier secuencia de CDR de IMGT y Kabat solapante se muestra en negrita, cursiva y subrayada y, cuando sea aplicable, la localización de la mutación LALA se muestra en negrita y subrayada.
- ii. Las secuencias de aminoácidos y de ADNc para la cadena pesada completa se proporcionan sin lisina C-terminal opcional.
- iii. El dominio variable, de cadena ligera completa se muestra en cursiva, las CDR según el esquema de Kabat se muestran en cursiva y subrayadas, las CDR según el esquema de IMGT se muestran en cursiva en negrita, por lo tanto, cualquier secuencia de CDR de IMGT y Kabat solapante se muestra en negrita, cursiva y subrayada.
- iv. En la secuencia de aminoácidos de dominios variables, las CDR según el esquema de Kabat se muestran en cursiva y subrayadas, las CDR según el esquema de IMGT se muestran en cursiva en negrita, por lo tanto, cualquier secuencia de CDR de IMGT y Kabat solapante se muestra en negrita, cursiva y subrayada.
- v. Se proporcionan secuencias de aminoácidos de CDR según los esquemas de Kabat e IMGT.

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/280_02_G02

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 65)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWI<u>SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYCAR<u>DLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVV VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 93)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWI<u>SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYCAR<u>DLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPCPAPE<u>AAGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVV</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPG
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 45)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWI<u>SAYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYCAR<u>DLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSS</u>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 95)	ISAYNGNT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 78)	WISAYNGNTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSYWW
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSYWW
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 66)	QSALTQPASVGSPGQSIT <u>ISCTGTSSDVGGYNSWYQQFPKA</u> <u>PKLMIFEVTNRPSGVSDRSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCS</u> <u>SFKRGSTLVVFGGGTKLTVLGQPAAPSVTLFPPSSEELQANKATL</u> VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 46)	QSALTQPASVGSPGQSIT <u>ISCTGTSSDVGGYNSWYQQFPKA</u> <u>PKLMIFEVTNRPSGVSDRSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCS</u> <u>SFKRGSTLVVFGGGTKLTVL</u>

LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 96)	SSDVGGYNS
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 26)	TGTSSDVGGSNSVS
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 77)	EVT
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 13)	EVTNRPS
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 14)	SSFKRGSTLVV
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 14)	SSFKRGSTLVV

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/280_02_G02_NS

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 63)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFT <u>SYG</u> /SWVRQAPGQG LEWMG <u>WISAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSVVTPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVWD</u> VSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 97)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFT <u>SYG</u> /SWVRQAPGQG LEWMG <u>WISAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSVVTPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVWD</u> VSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 43)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFT <u>SYG</u> /SWVRQAPGQG LEWMG <u>WISAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYYWGQGTLTVSS</u>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 98)	ISAYNSNT
HCDR2 (AA) Kabat) (SEQ ID NO: 23)	WISAYNSNTNYAQKLQG

HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSY YYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSY YYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 64)	QSALTQPASVSGSPGQSITIS <u>CTGSSDVGGYNSVSWYQQFPGKA</u> <u>PKLMIFEVTNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCS</u> <u>SFKRGSTLVVF</u> GGGTKLTVLGQPAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 44)	QSALTQPASVSGSPGQSITIS <u>CTGSSDVGGYNSVSWYQQFPGKA</u> <u>PKLMIFEVTNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCS</u> <u>SFKRGSTLVVF</u> GGGTKLTVL
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 96)	SSDVGGYNS
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 26)	TGTSSDVGGYNSVS
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 77)	EVT
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 13)	EVTNRPS
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 14)	SSFKRGSTLVV
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 14)	SSFKRGSTLVV

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/894_08_E05

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 57)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGY <u>TFTSYG</u> /SWVRQAPGQG <u>LEWMGWISAYNSNTNYAQKLQGRVTM</u> TTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYC <u>ARDLFPTIFGVSY</u> YYYYW <u>GQGTLVTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTV <u>PSSSLGTQTYICNVN</u> HKPNTKV <u>DKKVEPKS</u> CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVK <u>GFPYPSDIA</u> VEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
---	--

AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 99)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQQ LEWMGW<u>I</u>SAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYC<u>A</u>RDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP LQSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE<u>A</u>AGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVV VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 37)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQQ LEWMGW<u>I</u>SAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYC<u>A</u>RDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSS</i>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 98)	ISAYNSNT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 23)	WISAYNSNTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSYWW
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSYWW
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 58)	<i>D/QMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL LIYE<u>A</u>SNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSY</u> <u>STPRVT</u>FGQGTKEIKRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 38)	<i>D/QMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL LIYE<u>A</u>SNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSY</u> <u>STPRVT</u>FGQGTKEIK</i>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/887_04_E12

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 53)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFT<u>SYG</u>/SWVRQAPGQQ LEWMG<u>WISAYNSNTNYA</u>QKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYC<u>ARDLFPTI</u>FGV<u>SYYYY</u>WGQGT<u>LTVSS</u>ASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTV<u>PSSSLGT</u>QTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE<u>AAGGPSVFL</u>FPPKP<u>KDTLMISRTPEVTCVVVD</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREE<u>EQYNSTYRVVSVLVLH</u> QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP<u>REPQVYTLPPSRD</u> ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI<u>AVEWESNGQPENNYK</u>TTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW<u>QQGNVFCSVMHEALHNHYTQ</u>KSLSLSPG</i>
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 101)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFT<u>SYG</u>/SWVRQAPGQQ LEWMG<u>WISAYNSNTNYA</u>QKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYC<u>ARDLFPTI</u>FGV<u>SYYYY</u>WGQGT<u>LTVSS</u>ASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTV<u>PSSSLGT</u>QTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE<u>AAGGPSVFL</u>FPPKP<u>KDTLMISRTPEVTCVVVD</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREE<u>EQYNSTYRVVSVLVLH</u> QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP<u>REPQVYTLPPSRD</u> ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI<u>AVEWESNGQPENNYK</u>TTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW<u>QQGNVFCSVMHEALHNHYTQ</u>KSLSLSPG</i>
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 33)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFT<u>SYG</u>/SWVRQAPGQQ LEWMG<u>WISAYNSNTNYA</u>QKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYC<u>ARDLFPTI</u>FGV<u>SYYYY</u>WGQGT<u>LTVSS</u></i>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 102)	GYPFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 98)	ISAYNSNT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 23)	WISAYNSNTNYA <u>QKLQG</u>
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTI <u>FGV</u> YYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTI <u>FGV</u> YYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 54)	<i>DIQMTQSP<u>STLSASVRDRV</u>I<u>TCRASQSIGNRL</u>AWYQHKPGKAPKL LI<u>YEASTSET</u>GVP<u>SRFSGSGSGTDFTL</u>TI<u>SSLQPEDFATYYC</u><u>QQSY</u> <u>STPYTFGQGT</u>KLEIKRTAAAAPS<u>VIFPPSDEQLKSGTASWCLNN</u> FYPREAKVQW<u>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSK</u> ADYEKH<u>HKLYACEVTHQGLSSPVTKS</u>FN<u>RGE</u>C</i>
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 34)	<i>DIQMTQSP<u>STLSASVRDRV</u>I<u>TCRASQSIGNRL</u>AWYQHKPGKAPKL LI<u>YEASTSET</u>GVP<u>SRFSGSGSGTDFTL</u>TI<u>SSLQPEDFATYYC</u><u>QQSY</u> <u>STPYTFGQGT</u>KLEIK</i>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO:	QSIGNR

103)	
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 15)	RASQSIGNRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 16)	EASTSET
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/887_04_G12

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 55)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWI<u>SAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYC<u>ARDLFPTIFGVSYYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP LQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK CDKTHTCPPCPAPE<u>AAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> VSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 104)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWI<u>SAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYC<u>ARDLFPTIFGVSYYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP LQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK CDKTHTCPPCPAPE<u>AAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> VSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 35)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWI<u>SAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYC<u>ARDLFPTIFGVSYYYYWGQGTLTVSS</u>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 98)	ISAYNSNT
HCDR2 (AA) Kabat) (SEQ ID NO: 23)	WISAYNSNTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSYYYY

HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVYYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 56)	D/QMTQSPSTSASVGDRVTIT <u>C</u> RASQS/ <u>S</u> GRLAWYQQKPGKAPNL LIYE <u>A</u> SN <u>L</u> ESGVPSRFSGSGTEFTLT <u>I</u> SSLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>SWPRT</u> FGQGTKVEIKRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 36)	D/QMTQSPSTSASVGDRVTIT <u>C</u> RASQS/ <u>S</u> GRLAWYQQKPGKAPNL LIYE <u>A</u> SN <u>L</u> ESGVPSRFSGSGTEFTLT <u>I</u> SSLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>SWPRT</u> FGQGTKVEIK
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 77)	EASN
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 21)	QQSYSWPRT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 21)	QQSYSWPRT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/894_08_A05

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 59)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSK <u>CASGYTFTSYG</u> /SWVRQAPGQG LEWMG <u>W</u> <u>I</u> AYNSNTNYAQKLQGRVTM <u>T</u> DTST <u>T</u> STAY <u>M</u> ELRSLRS DDTAVYYCAR <u>DLFPTIFGV</u> YYYYWGQGTLTVSSASTKGPSV <u>FPL</u> APSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP <u>AV</u> LQSSGLYS <u>LSSV</u> TV <u>PSSSLGT</u> QTYICNVN <u>H</u> KPSNTKVDKKVE <u>PKS</u> CDK <u>T</u> HTC <u>PPCPA</u> PELLGGPSVFLPP <u>KPKD</u> TL <u>MISRT</u> PEV <u>TC</u> V <u>WD</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN <u>AKT</u> KPREE <u>QYN</u> STYR <u>V</u> SVLTV <u>LH</u> QDWLNGKEYKCKVS <u>N</u> KAL <u>PAPIEKT</u> ISKAKGQPREPQVYTL <u>PPSRD</u> ELTKN <u>QVSL</u> TC <u>LVKG</u> FYPSDI <u>AVEWE</u> NGQPENNYK <u>TPVLDSD</u> GSFFLYSKLTV <u>DKSRW</u> QQGNVFSCSV <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 105)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSK <u>CASGYTFTSYG</u> /SWVRQAPGQG LEWMG <u>W</u> <u>I</u> AYNSNTNYAQKLQGRVTM <u>T</u> DTST <u>T</u> STAY <u>M</u> ELRSLRS DDTAVYYCAR <u>DLFPTIFGV</u> YYYYWGQGTLTVSSASTKGPSV <u>FPL</u> APSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP <u>AV</u> LQSSGLYS <u>LSSV</u> TV <u>PSSSLGT</u> QTYICNVN <u>H</u> KPSNTKVDKKVE <u>PKS</u> CDK <u>T</u> HTC <u>PPCPA</u> PE <u>AAGGPSVFLPP</u> KPKD <u>TL</u> <u>MISRT</u> PEV <u>TC</u> V <u>WD</u>
	VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN <u>AKT</u> KPREE <u>QYN</u> STYR <u>V</u> SVLTV <u>LH</u> QDWLNGKEYKCKVS <u>N</u> KAL <u>PAPIEKT</u> ISKAKGQPREPQVYTL <u>PPSRD</u> ELTKN <u>QVSL</u> TC <u>LVKG</u> FYPSDI <u>AVEWE</u> NGQPENNYK <u>TPVLDSD</u> GSFFLYSKLTV <u>DKSRW</u> QQGNVFSCSV <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>

AA del dominio VH (SEQ ID NO: 39)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQQ LEWMGW<u>ISAYNSNTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYWGQGTLTVSS</u>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 98)	ISAYNSNT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 23)	WISAYNSNTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSVYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSVYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 60)	D/QMTQSPTLSASVGDRVTITC<u>RASQSISGRLA</u>WYQQKPGKAPNL <u>LIEASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSQPDDFATYYCQQAN</u> <u>TFPRVS</u>FGGGTKEI/KRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 40)	D/QMTQSPTLSASVGDRVTITC<u>RASQSISGRLA</u>WYQQKPGKAPNL <u>LIEASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSQPDDFATYYCQQAN</u> <u>TFPRVS</u>FGGGTKEI/K
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 106)	EASN
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 24)	QQANTFPRVS
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 24)	QQANTFPRVS

Secuencias de aminoácidos y ADNc de cadenas pesadas y ligeras y dominios variables de G1AA/E05v2 y secuencia de aminoácidos de CDR

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 107)	<pre> EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGGTNYAQKLQGRVTM</u>TTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCAR<u>DLFPTIFGV</u>SYYYYWGQGT<u>LTVSSA</u>STKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPS<u>SSLGT</u>QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD<u>TLMISRT</u>PEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN<u>AKTP</u>REEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG </pre>
ADN de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 108)	<pre> GAAGTGCA<u>GCTGGTGCAGTCCGGAGGCCAAGTC</u>AAGAGGCCCT GGAGCGTCCGTGAAGGTGT<u>CCTGCAAAGCCTCAGGATA</u>CACCT TCAC<u>TTCGTACGGGATTTC</u>CTGGTCCGCCAACGACC<u>CGGGTCA</u> AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCGTATT<u>CCGGGGGA</u> ACCAACTACGCTAAAAGCTGCAGGGT<u>CGCGTGACCATGACCA</u> CCGATA<u>ACCTCACCTCAACGGCCTACATGGA</u>ACTGAGATCTCTG CGGAGCGACGACACTGCCGT<u>TACTACTGTGCCCCGGACCTGT</u> TCCCCACTATCTT<u>CGGAGTGT</u>CGTACTACTACT<u>ACTGGGGCCAG</u> GGGACTCTCGT<u>GACCGTGT</u>CGAGCGTAGCA<u>CTAAGGGCCC</u>GT CGGTGTT<u>CCCGCTGGCCCC</u>ATCGTCC<u>AAAGAGCACATCAGGGGG</u> TACCGCCGCC<u>CTGGCTGCCTTG</u>TAAGGGATT<u>ACTTCCGAG</u> CCCGTCACAGTGT<u>CCTGGAACAGCGGAGCC</u>CTGAC<u>CTCCGGAG</u> TGCATA<u>CTTCCCGCTGTGCTT</u>CAGTC<u>CTGGCCTGT</u>ACTCA TTGTC<u>CTCCCGTGGT</u>CACCGT<u>CCCTCGT</u>CTCC<u>CTGGCACCC</u> </pre>

	AGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAG GTCGACAAGAAGGTGAGGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCAC CTTGGCCCGCCTGCCAGCCCCGGAACTGCTGGTGGTCCTTC GGTGTTCCTCTCCGCCAACGCCGAAGGATACCCGTATGATCT CACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGACGTGTCCA CGAGGACCCCGAACGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG GAAGTGCACAACGCCAACGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACA ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAA GACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACA AGGCGCTGCCTGCCAACATTGAGAAAATCTCGAAAGCCAA GGGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCTCCCTCT CGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTGG TCAAGGGATTCTACCCATCGGATATCGCCGTGGAATGGGAAAG CAACGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACGACTCCGCCCGTG CTGGATTCCGACGGGAGCTTCTTGTACTCCAAGCTGACCGT CGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTGCTCC GTGATGCATGAGGCCTGCACAACCAACTACACTCAGAAGAGCT TGTCCCTGTCGCCCGGA
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 51)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQG LEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVWD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNIKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
ADN de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 109)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGGCT GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCT TCACTTCGTACGGGATTCTGGTCCGCCAACGACCCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTAAAGCTGCAGGGTCCGTGACCATGACCA CCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAACTGAGATCTCTG

	CGGAGCGACGACACTGCCGTACTACTGTGCCGGGACCTGT TCCCCACTATCTCGGAGTGTGACTACTACTACTGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCGT CGGTGTTCCGCTGGCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGG TACCGCCGCCCTGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTCCCAG CCCGTCACAGTGTCCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAG TGCATACTTCCCAGCTGTGCTTCAGTCCTCTGGCCTGTACTCA TTGTCCCTCGTGGTACCGTCCCTCGTCCCTGGGACCCC AGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAAG GTCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTACA CTTGCCCGCCTTGCAGCCCCGGAAAGCTGCCGGTGGCCTTC GGTGTCCCTCTCCCGCCAAGCCGAAGGATAACCTGATGATCT CACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGACGTGTC CGAGGACCCGGAAGTGAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGGCCACGGGAAGAACAGTACA ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAA GAUTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACA AGGCGCTGCCATGCCCAATTGAGAAAATATCTGAAAGCCAA GGGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCTCC CGGGACGAGCTGACCAAGAACGACTCCCTGACCTGTCTGG TCAAGGGATTCTACCCATCGGATATGCCGTGGAATGGGAAAG CAACGGACAGCCGAGAACAACTACAAGACGACTCCGCCGTG CTGGATTCCGACGGGAGCTTCTTGTACTCCAAGCTGACCGT CGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCCCTGCTCC GTGATGCATGAGGCCTGCACAACCAACTACACTCAGAAGAGCT TGTCCCTGTCGCCCGA
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 31)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQG LEWMGWI SAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSS
ADN del dominio VH (SEQ ID NO: 110)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGCC GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCT TCACTTCGTACGGATTTCCTGGTCCGCCAAGCACCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTAAAAGCTGCAGGGTCCGTGACCATGACCA
	CCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAACTGAGATCTCTG CGGAGCGACGACACTGCCGTGACTACTGTGCCGGGACCTGT TCCCCACTATCTCGGAGTGTGACTACTACTACTGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGC
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 111)	ISAYSGGT

CDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 18)	WISAYSGGNTNYAQKLQG
CDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSY YY
CDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSY YY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 52)	D/QMTQSPSTLSASVGDRV <u>T/TCRASQSISGR</u> LAWYQQKPGKAPNL LIYE <u>AASNLES</u> GVPSRFSGSGT <u>EFTL</u> TISSLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>STPRVT</u> FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIPPSDEQLKSGTASVVC LLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN de la cadena ligera (SEQ ID NO: 112)	GACATTCA <u>GATGACCCAATCCCCGTCCACGCTGAGCGCCTCCG</u> TCGGTGATCGCGTGACAATCACTTGTCGGCGTGCAGTCCAT CTCTGGAAAGGCTCGCTGGTACCAGCAGAACGCTGGAAAGGCT CCCAACCTCCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGAG TGCCTAGCCGGTT <u>CAGCGGATCAGGGTCCGGTACCGAGTT</u> CAC CCTGACCATTCCCTCGCTCCAA <u>ACTGAGGACTTCGCCACCTACT</u> ACTGCCAACAGTCCATTCAACTCCGCGCGTGA <u>CCCTCGGCCA</u> GGGCACTAAGGT <u>CGAAATCAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCG</u> GTGTTTATCTCCCGCCCTCGGACGAACAGCTGAAGTCAGGCA CTGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAA <u>TTCTACCCGCGCGAA</u> GCTAAGGTCCAGTGGAA <u>GGTCGACAACCGCCTGCAGTCCGGAA</u> ACAGCCAGGAGTCAGTGA <u>CCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCAC</u>
	TTATTCCCTGTC <u>CTCCACCC</u> GTGACTTGAGCAAGGCC <u>GA</u> ACTACG AGAACGCAAA <u>AGTGTACGCC</u> TCGCAAGTGA <u>CCCATCAAGGG</u> CT TTCGTG <u>CCCGT</u> GACCAAGAG <u>CTTAACCGGGCGAATGC</u>
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 32)	D/QMTQSPSTLSASVGDRV <u>T/TCRASQSISGR</u> LAWYQQKPGKAPNL LIYE <u>AASNLES</u> GVPSRFSGSGT <u>EFTL</u> TISSLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>STPRVT</u> FGQGTKVEIK
ADN del dominio VL (SEQ ID NO: 113)	GACATTCA <u>GATGACCCAATCCCCGTCCACGCTGAGCGCCTCCG</u> TCGGTGATCGCGTGACAATCACTTGTCGGCGTGCAGTCCAT CTCTGGAAAGGCTCGCTGGTACCAGCAGAACGCTGGAAAGGCT CCCAACCTCCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGAG TGCCTAGCCGGTT <u>CAGCGGATCAGGGTCCGGTACCGAGTT</u> CAC CCTGACCATTCCCTCGCTCCAA <u>ACTGAGGACTTCGCCACCTACT</u> ACTGCCAACAGTCCATTCAACTCCGCGCGTGA <u>CCCTCGGCCA</u> GGGCACTAAGGT <u>CGAAATCAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCG</u>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGR LA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES

LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT

Secuencias de aminoácidos y ADNc de cadenas pesadas y ligeras y dominios variables de G1AA/E12v2 y secuencia de aminoácidos de CDR

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 114)	<pre> EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> </pre>
	<pre> APSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG </pre>
ADN de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 115)	<pre> GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGCCCT GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCCTGCAAAGCCTCAGGATAACCCCT TCACTTCGTACGGATTTCCTGGTCCGCCAACGCACCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTAAAAGCTGCAGGGTCCGTGACCATGACCA CCGATACTCCACCTCACGGCCTACATGGAACGTGAGATCTTG CGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGACCTGT TCCCCACTATCTCGGAGTGTGTACTACTACTGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCGT CGGTGTTCCCGCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTCCCGAG TACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTCCCGAG CCCGTCACAGTGTCCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAG TGCATACTTCCCGCTGTGCTTCAGTCCTCTGGCCTGTACTCA TTGTCCTCCGTGGTACCGTCCCTCGTCCCTGGCACCC AGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAAG GTCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACA CTTGGCCGCCCTGGCAGCCCCGGAACTGCTGGTGGTGGCCTTC GGTGTCCCTTCCCGCCAAGCCGAAGGATAACCTGATGATCT CACGGACCCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG GAAGTGCACAACGCCAACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACA ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAA GAECTGGCTGAACGGGAAGGGAGTACAAGTGCACAGTGTCCAACA AGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGAAAATCTCGAAAGCCAA GGGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCCTGCCCTCCCTCT CGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTGG TCAAGGGATTCTACCCATCGGATATGCCGTGGAATGGGAAAG</pre>

	CAACGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACGACTCCGCCGTG CTGGATTCCGACGGGAGCTTCTCTTGACTCCAAGCTGACCGT CGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCTCC GTGATGCATGAGGCCTGCACAACCACACTACACTCAGAAGAGCT TGTCCCTGTCGCCCGGA
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 47)	EVQLVQSGAEVKRPGAVKVSKASGYPFTSYGISWVRQAPGQQ LEWMG <u>WISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVWD</u> VSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQGPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
ADN de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 116)	GAAGTGCAGCTGGTGAGTCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGCC GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGATAACCCCT TCACTTCGTACGGGATTCCTGGTCCGCCAACGCACCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTAAAAGCTGCAGGGTCCGCGTACCATGACCA CCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAACGTGAGATCTCG CGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCGGGACCTGT TCCCCACTATCTCGGAGTGTGTACTACTACTACTGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCGT CGGTGTTCCCGCTGGCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGG TACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGTGAAGGATTACTTCCCAG CCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAG TGCATACTTCCCGCTGTGCTTCAGTCCTCTGGCCTGTACTCA TTGTCTCCGTGGTACCGTCCCTCGTCCTCCCTGGCACCC AGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTGAACACCAAG GTCGACAAGAAGGTGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACA CTTGGCCCGCCTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGCTTC GGTGTCTCTTCCGCCAAGCCGAAGGATAACCTGATGATCT CACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGACGTGTCCA

	CGAGGACCCGGAAGTGAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG GAAGTGCACAACGCCAACGACCAAGGCCACGGGAAGAACAGTACA ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAA GACTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCACAAAGTGTCCAACA AGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGAAAATCTCGAAAGCCAA GGGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCTCCCTCT CGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTGG TCAAGGGATTCTACCCATCGGATATGCCGTGGAATGGGAAAG CAACGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACGACTCCGCCCGTG CTGGATTCCGACGGGAGCTTCTCTGTACTCCAAGCTGACCGT CGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTGCTCC GTGATGCATGAGGCCTGCACAACCAACTACACTCAGAAGAGCT TGTCCCTGTCGCCCGGA
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 27)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKAS <u>GYPFTSYG</u> /SWVRQAPGQQ LEWMG <u>WISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYWGQGTIVTVSS</u>
ADN del dominio VH (SEQ ID NO: 117)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGGCCAGTCAGAGAGGCT GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCCTGCAAAGCCTCAGGATAACCCCT TCACTTCGTACGGGATTTCCTGGTCCGCCAACGACCCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTAAAAGCTGCAGGGTCCCGTGAACCATGACCA CCGATACTCCACCTCAACGCCCTACATGGAACGTGAGATCTCTG CGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCGGGACCTGT TCCCCACTATCTCGGAGTGTGTACTACTACTACTGGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGC
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 102)	GYPFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 111)	ISAYSGGT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 18)	WISAYSGGTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSVYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSVYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 48)	D/QMTQSPTLSASVRDRVII <u>T</u> <u>C</u> <u>R</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>Y</u> <u>Q</u> <u>H</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>Q</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>A</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>W</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>E</u> <u>Q</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>K</u> DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ADN de la cadena ligera (SEQ ID NO: 118)	GACATCCAGATGACGCAGAGCCCGTCTACCCGTCCGCCTCCG TGAGAGATCGCGTGATCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGTCCAT CGGAAACCGCTTGGCGTGGTACCAGCACAAGCCTGGGAAGGCT CCGAAGCTGCTCATCTACGAAGCCTCGACTCGGAGACTGGTG TCCCTAGCCGGTTCAGCGGATCGGGATCAGGGACCGATTAC TCTGACCATTCCCTCCCTGCAACCCGAGGACTCGCCACCTACT ACTGCCAACAGTCATATTCCACCCCGTACACCTCGGACAAGGC ACCAAGCTCGAAATCAAGCGGACTGTCGCCGCACCTTCCGTGT TCATTTCCCACCCCTCCGACGAACAGCTGAAATCGGGTACAGCT AGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAATTCTACCCGCGCGAAGCTAA GGTCCAGTGBAAGGTCGACAACCGCGCTGCAGTCGGAAACAGC CAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACTTATTC CCTGTCCTCCACCCCTGACTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAAG CACAAAGTGTACGCCCTGCGAAGTGACCCATCAAGGGCTTCGT CGCCCGTGACCAAGAGCTCAACCGGGCGAATGC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 28)	D/QMTQSPSTLSASVRDRVII TCRASQSIGNRLAWYQHKPGKAPKL LIYEASTSETGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY STPYTFGQGTKLEIK
ADN del dominio VL (SEQ ID NO: 119)	GACATCCAGATGACGCAGAGCCCGTCTACCCGTCCGCCTCCG TGAGAGATCGCGTGATCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGTCCAT CGGAAACCGCTTGGCGTGGTACCAGCACAAGCCTGGGAAGGCT CCGAAGCTGCTCATCTACGAAGCCTCGACTCGGAGACTGGTG TCCCTAGCCGGTTCAGCGGATCGGGATCAGGGACCGATTAC TCTGACCATTCCCTCCCTGCAACCCGAGGACTCGCCACCTACT ACTGCCAACAGTCATATTCCACCCCGTACACCTCGGACAAGGC ACCAAGCTCGAAATCAAG
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 103)	QSIGNR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 15)	RASQSIGNRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 16)	EASTSET
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT

Secuencias de aminoácidos y ADNc de cadenas pesadas y ligeras y dominios variables de G1AA/G12v2 y secuencia de aminoácidos de CDR

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 120)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFT <u>SYG</u> /SWVRQAPGQQ LEWMG <u>WISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYWQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPNAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVWD VSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
ADN de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 121)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGGCT GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCT TCACTTCGTACGGATTCTCTGGTCCGCCAACGACCCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTAAAAGCTGCAGGGTCCGCGTGACCATGACCA CCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAAC TGAGATCTCTG

	CGGAGCGACGACACTGCCGTACTACTGTGCCGGGACCTGT TCCCCCACTATCTCGGAGTGTGACTACTACTACTGGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCCTG CGGTGTTCCCGCTGGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGG TACCGCCGCCCTGGGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTCCCGAG CCCGTCACAGTGTCCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAG TGCATACTTCCCAGCTGTGCTTCAGTCCTCTGGCCTGTACTCA TTGTCCCTCCGTGGTCACCGTCCCTCGTCCCTGGGACCCC AGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAAG GTCGACAAGAAGGTGAGGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACA CTTGCCCGCCTTGCAGCCCCGGAACTGCTGGTGGACGTGTCCCA CGAGGACCCCGGAAGTGAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGGCCACGGGAAGAACAGTACA ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGTCACTGTGCTGCACCAA GAUTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACA AGGCGCTGCCCTGCCCAATTGAGAAAATATCTGAAAGCCAA GGGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCTCCCT CGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTGG TCAAGGGATTCTACCCATCGGATATGCCGTGGAATGGGAAAG CAACGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACGACTCCGCCGTG CTGGATTCCGACGGGAGCTTCTTGTACTCCAAGCTGACCGT CGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCCCTGCTCC GTGATGCATGAGGCCTGCACAACCAACTACACTCAGAAGAGCT TGTCCCTGTCGCCCGA
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 49)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/ISWVRQAPGQG LEWMG <u>WISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYWGQGT</u> TVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE <u>AAAGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVWD</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ADN de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 122)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCT GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCT TCACTTCGTACGGATTCTGGTCCGCCAAGCACCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCCGTGACCATGACCA CCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGAACTGAGATCTCG CGGAGCGACGACACTGCCGTACTACTGTGCCGGACCTGT TCCCCACTATCTCGGAGTGTGTTACTACTACTACTGGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCGT CGGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGG TACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGTGAAGGATTACTTCCCAG CCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAG TGCATACTTCCCAGCTGTGCTTCAGTCCTCTGGCCTGTACTCA TTGTCCTCCGTGGTCAACCGTCCCTCGTCCTCCCTGGGCACCC AGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAG GTCGACAAGAAGGTGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACA CTTGGCCGCCCTGGCCAGCCCCGGAAAGCTGCCGGTGGTCCTC GGTGTCTCTTCCCCCGCAAGCCGAAGGATAACCTGATGATCT CACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGACGTGTCCA CGAGGACCCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACA ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTACTGTGCTGCACCAA GAUTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCACAAAGTGTCCAACA AGGCGCTGCCCTGCCCAATTGAGAAAATCTCGAAAGCCAA GGGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCTCCCT CGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTGG TCAAGGGATTCTACCCATCGGATATGCCGTGGAATGGAAAG CAACGGACAGCCGAGAACAACTACAAGACGACTCCGCCGTG CTGGATTCCGACGGAGCTTCTTGTACTCCAAGCTGACCGT CGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTGCTCC GTGATGCATGAGGCCTGCACAAACCAACTACACTCAGAACAGAGCT TGTCCCTGTCGCCCGGA
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 29)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQG LEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYWGQGTLTVSS

ADN del dominio VH (SEQ ID NO: 123)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGATTCTGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCTATTCCGGGGACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCCGCTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAACGTGAGATCTCTCGGAGCGACGACACTGCCGTACTACTGTGCCGGACCTGTTCCCCACTATCTCGGAGTGTCTACTACTACTACTGGGGCCAGGGACTCTCGTGACCGTGTGAGC
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFSTYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 111)	ISAYSGGT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 18)	WISAYSGGTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVYYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVYYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 50)	D/QMTQSPSTLSASVGDRV/T/TCRASQS/ SGR LAWYQQKPGKAPNL LIYEASNLESGVPSRFSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY SWPRTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
ADN de la cadena ligera (SEQ ID NO: 124)	GACATTAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGTCCGCAAGCGTGGGGACAGAGTGACCATCACTGCCGCCCTACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCGGAAAGGCCAAACCTCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGC
	GTCCTTCGGTTCTCTGGCTCCGGTCCGGAACTGAGTTCA CCCTCACCATCTCGTCCCTGCAACCGGAAGATTGCCACCTACTACTGCCAACAGTCGACTCCTGGCCCCGGACATTGGACAGGGAACCAAAGTCGAGATTAAGCGGACTGTGGCGGCTCTAGCGTGTTCATTTCCCCGTCGACGAACAGCTGAAGTCCGGTACCGCTAGCGTGTAGCGTGGCTGTCTCCTGAACAATTCTACCCGCGCGAACATAAGGTCAGTGGAAAGGTCGACAACCGCGCTGCAGTCCGGAAACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCCACTTATTCCCTGTCCTCCACCCGTACTTGAGCAAGGCCACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCCTGCGAAGTGACCCATCAAGGGCTTCGTCGCCCCGTGACCAAGAGCTCAACCGGGCGAATGC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 30)	D/QMTQSPSTLSASVGDRV/T/TCRASQS/ SGR LAWYQQKPGKAPNL LIYEASNLESGVPSRFSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY SWPRTFGQGTKVEIK

ADN del dominio VL (SEQ ID NO: 125)	GACATTAGATGACCCAGTCCCCGAGCAGCAGCTGTCCGCAAGCG TGGGGGACAGAGTGACCACACTGCCGCCTCACAAATCCAT CAGCGGACGCTTGGCCTGGTACCAAGCAGAAGCCGGAAAGGC CCCAAACCTCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGC GTCCCTCGCGTTCTGGCTCCGGTCCGGAACTGAGTTCA CCCTCACCATCTCGTCCCTGCAACCGGAAGATTCGCCACCTAC TACTGCCAACAGTCGTACTCCTGGCCCCGGACATTGGACAGG GAACCAAAGTCGAGATTAAG
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSI SGR LA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 21)	QQSYSWPRT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 21)	QQSYSWPRT

Secuencias de aminoácidos y ADNc de cadenas pesadas y ligeras y dominios variables de G1AA/lambdaV3 y secuencia de aminoácidos de CDR

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 126)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG <u>LEWMGWI SAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYCAR <u>DLFPTIFGVSYYYYWGQGT</u> LVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
--	---

ADN de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 127)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGCCT GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCT TCACTTCGTACGGATTCTGGTCCGCCAACGACCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCCGTGACCATGACCA CCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGAACTGAGATCTCG CGGAGCGACGACACTGCCGTACTACTGTGCCGGACCTGT TCCCCACTATCTCGGAGTGTCTGACTACTACTACTGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCGT CGGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGG TACCGCCGCCCTGGCTGCCTGTGAAGGATTACTTCCCAG CCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAG TGCATACTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCTCTGGCTGTACTCA TTGTCCTCCGTGGTACCGTCCCTCGTCCTCCCTGGCACCC AGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAAG GTCGACAAGAAGGTGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACA CTTGGCCGCCCTGCCAGCCCCGGAACTGCTGGTGGTCCTTC GGTGTCTCTTCCCAGCCAAAGCCGAAGGATACCTGATGATCT CACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGACGTGTCCA CGAGGACCCCGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG GAAGTGCACACGCCAACGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACA ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTACTGTGCTGCACCAA GAUTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAGTCAAAGTGTCCAACA AGGCCTGCCTGCCCAATTGAGAAAATCTCGAAAGCCAA GGGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCCTGCCTCCCT CGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTGG TCAAGGGATTCTACCCATCGGATATCGCCGTGGAATGGGAAAG CAACGGACAGCCGAGAACAACTACAAGACGACTCCGCCGTG CTGGATTCCGACGGGAGCTTCTCTGTACTCCAAGCTGACCGT CGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCTGCTCC GTGATGCATGAGGCCGTGCACAACCAACTACACTCAGAAGAGCT TGTCCCTGTCGCCCGGA
AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 61)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWI <u>SAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWQGQT</u> LTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE <u>AAGGPSVFLPPPKDLMISRTPEVTCVWD</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ADN de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 128)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGCCT GGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCT TCACTTCGTACGGATTCTGGTCCGCCAACGACCGGGTCA AGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCTATTCCGGGGGA ACCAACTACGCTAAAAGCTGCAGGGTCCGTGACCATGACCA CCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGAACTGAGATCTCTG CGGAGCGACGACACTGCCGTACTACTGTGCCGGACCTGT TCCCCACTATCTCGGAGTGTCTACTACTACTACTGGGGCCAG GGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAGGGCCCGT CGGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGG TACCGCCGCCCTGGCTGCCTGTGAAGGATTACTTCCCAGAG CCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGAG TGCATACTTCCCAGCTGTGCTTCAGTCCTCTGGCCTGTACTCA TTGTCCTCCGTGGTCACCGTCCCTCGTCCCTGGCACCC AGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTCGAACACCAAG GTCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACA CTTGGCCGCCCTGGCCAGCCCCGGAAAGCTGCCGGTGGTCCTTC GGTGTCCCTCTTCCCAGCCAAAGCCGAAGGATAACCTGATGATCT CACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGACGTGTCCCA CGAGGACCCCCGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTG GAAGTGCACACGCCAAGACCAAGCCACGGGAAGAACAGTACA ACTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAA GAUTGGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACA AGGCGCTGCCGCCAATTGAGAAAATCTCGAAAGCCAA GGGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCTGCCCTCCCT CGGGACGAGCTGACCAAGAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTGG TCAAGGGATTCTACCCATCGGATATGCCGTGGAATGGGAAAG CAACGGACAGCCGAGAACAACTACAAGACGACTCCGCCGTG CTGGATTCCGACGGGAGCTTCTTGTACTCCAAGCTGACCGT CGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTGCTCC GTGATGCATGAGGCCTGCACAACCAACTACACTCAGAAGAGCT TGTCCCTGTCGCCCGGA
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 41)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFSTSYGISWVRQAPGQG LEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQQTLTVSS

ADN del dominio VH (SEQ ID NO: 129)	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCGGAGCCGAAGTCAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGATTCTGGTCCGCCAAGCACCGGGTCAAGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGGTATTCCGGGGACCAACCAACTACGCTCAAAAGCTGCAGGGTCCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAACGTGAGATCTCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCGGGACCTGTTCCCCACTATCTCGGAGTGTGTACTACTACTACTGGGGCCAGGGACTCTCGTGACCGTGTGAGC
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 111)	ISAYSGGT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 18)	WISAYSGGTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSYYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSYYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 62)	QSALTQPASVSGSPGQSITIS <u>CTGSSDVGGYNYVSWYQQFPKA</u> <u>PKLMIFEVTNRPSGVSDRFSKSNDNTASLTISGLQAEDAEYYCS</u> <u>SFKRGSTLVVF</u> GGGTKLTVLGQPAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
ADN de la cadena ligera (SEQ ID NO. 130)	CAGTCGGCCCTTACTCAACCCGCGTCAGTCTCCGGTAGCCCCGGACAGTCATCACGATTCTGTGCACCGGAACCAGCAGCGATGTCGGGGATACAACACTACGTGTCCTGGTACCAAGCAGTTCCGGGAAGGCCCCTAAGCTGATGATCTCGAAGTCACTAACAGACCTTCGGAGTGTGGACCAGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGACAACACTGCGAGCCTGACCATCTCGGGCTGCAAGCCGAGGACGAAGCCGAGTACTACTGTAGCTCATTCAAGCGCGGTTCCACCCCTCGTGGTGTTCGGCGGTGGCAACTAAGCTCACCGTGTGGACAGCCAGCCGCAGCTCCTAGCGTGACCTGTTCCCCCGTCGAGCGAAGAAC TGCAGGCCAACAGGCCACCCCTCGTCTGCCGTGATCTCCGACTTCTACCCCTGGGCCGTGACTGTGGCTGGAAAGGCCATTCAAGCCAGTGAAAGCCGGAGTGGAAACCACCACTCCGTCCAAGCAGTCGAAACAATAAGTATGCCCGTCCCTCACCTGTCGCTGACCCGGAGCAGTGGCTCCACCGACTCACGAAGGGTCCACTGTGGAGAAAACAGTGGCTCCACCGAGTGCTCT
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 42)	QSALTQPASVSGSPGQSITIS <u>CTGSSDVGGYNYVSWYQQFPKA</u>

	<u>PKLMIFEVNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCS</u> <u>SFKRGSTLVVFGGGTKLTVL</u>
ADN del dominio VL (SEQ ID NO: 131)	CAGTCGGCCCTTACTCAACCCGCGTCAGTCTCCGGTAGCCCCG GACAGTCCATCACGATTCTGTGCACCGGAACCAGCAGCGATGT CGGGGGATACAACACTACGTGTCTGGTACCAAGCAGTCCCAGGA AAGGCCCTAAAGCTGATGATCTCGAACGTTCAACTAACAGACCTTC CGGAGTGTGGACCGGTTCTCCGGCTCCAAGTCCGACAACACT GCGAGCCTGACCATCTCGGGCTGCAAGCCGAGGACGAAGCC GAGTACTACTGTAGCTATTCAAGCGCGGTTCCACCCCTCGTGGT GTTCGGCGGTGGCACTAACGTCACCGTGTGGGA
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 132)	SSDVGGYNY
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 25)	TGTSSDVGGYNYVS
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 77)	EVT
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 13)	EVTNRPS
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 14)	SSFKRGSTLVV
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 14)	SSFKRGSTLVV

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A07

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 133)	<u>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG</u> <u>LEWMGWISAYGGSTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> <u>APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPV</u> <u>LQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS</u> <u>CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLH</u> <u>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD</u>
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 134)	<u>ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	<u>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG</u> <u>LEWMGWISAYGGSTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSS</u>
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 135)	ISAYGGST
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 136)	WISAYGGSTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 1)	ARDLFPTIFGVSYWW

69)	
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVYYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 137)	<i>D/QMTQSPTLSASVGDRVТИCRA<u>SQSISGRL</u>AWYQQKPGKAPNL LIYEASNLESGVP<u>SRFS</u>SGSGSGTEFTLT<u>ISSLQPED</u>FATYYC<u>QQSY</u> STPRVTFGQGTKVEIKRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL KADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 138)	<i>D/QMTQSPTLSASVGDRVТИCRA<u>SQSISGRL</u>AWYQQKPGKAPNL LIYEASNLESGVP<u>SRFS</u>SGSGSGTEFTLT<u>ISSLQPED</u>FATYYC<u>QQSY</u> STPRVTFGQGTKVEIK</i>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A08

(Este clon es el mismo que G1AA/E05v2 pero sin la mutación LALA).

5

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 139)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFT<u>SYG</u>ISWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGGT</u>NYAQKLQGRVTM<u>TTDT</u>ST<u>STAY</u>MELRS<u>LRS</u> DDTAVYYCAR<u>DLFPTI</u>FGVYYYYWGQGT<u>LV</u>T<u>VSSA</u>STGPSVFPL APSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP LQSSGLYS<u>LSSV</u>TV<u>PSSSLG</u>TQTYICNVNH<u>KPSNT</u>KVDKKVEPK CDKTHTCP<u>PCPAE</u>LLGGPSVFLPPKPK<u>DLM</u>ISRTPEVTCVV VSHEDPEVKFNWYV<u>DGVEVHN</u>AKTP<u>REEQYN</u>STYRVVSVLTV QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI<u>EKTISKAKGQ</u>PREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSL<u>TCLVKG</u>FYPSDI<u>AVEWE</u>NGQPENNYK<u>TPVLDSD</u> GSFFLYSKL<u>TVDKS</u>RWQQGNV<u>FSCSV</u>MHEALHNHYTQ<u>KSLS</u>SPG</i>
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 140)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFT<u>SYG</u>ISWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGGT</u>NYAQKLQGRVTM<u>TTDT</u>ST<u>STAY</u>MELRS<u>LRS</u> DDTAVYYCAR<u>DLFPTI</u>FGVYYYYWGQGT<u>LV</u>T<u>VSSA</u>STGPSVFPL</i>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 111)	ISAYSGGT

HCDR2 (AA) Kabat) (SEQ ID NO: 18)	WISAYSGGTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSY YY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSY YY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 141)	<i>D/QMTQSPSTLSASVGDRVТИCRA<u>QSISGR</u>LAWYQQKPGKAPNL LIYE<u>ASNLES</u>GVP<u>SRFSGSGSGT</u>EFTLT<u>ISSLQPEDFATYYC</u><u>QQSY</u> <u>STPRVTFGQGT</u>KVEIKRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEKHLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 142)	<i>D/QMTQSPSTLSASVGDRVТИCRA<u>QSISGR</u>LAWYQQKPGKAPNL LIYE<u>ASNLES</u>GVP<u>SRFSGSGSGT</u>EFTLT<u>ISSLQPEDFATYYC</u><u>QQSY</u> <u>STPRVTFGQGT</u>KVEIK</i>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A09

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 143)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSK<u>ASGYTFTSYG</u>ISWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGN</u>ANYAQKLQGRVTM<u>TTDTST</u>STAY<u>MELRSLRS</u> DDTAVYY<u>CARDLFP</u>TIFGVSYYYWGQGT<u>LVTVSS</u>ASTKGPSVFPL APSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSW<u>NSGALTSGVHTFPAV</u> LQSSGLYSLSSVVTVPSS<u>SLGT</u>QTYICNVNH<u>KPSNTKV</u>DKKVEPKS CDKTH<u>TCPPCPA</u>PELLGGPSVFL<u>PPKPKD</u>TL<u>MISRTPEV</u>TCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA<u>KT</u>KPREEQYN<u>STYRVV</u>SVLTVH QDWLNGKEYKCKVSN<u>KALPAPIEKTISAKGQP</u>REPQVYTL<u>PSSRD</u></i>
	<i>ELTKNQVSL<u>TCLV</u>KGFYPSDI<u>AVEW</u>ESNGQ<u>PENNY</u>KTP<u>PPVLDSD</u> GSFFLYSKL<u>TVDKSRW</u>QQGNVFSCSVMHEALHN<u>HTQKSLSLSPG</u></i>
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 144)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSK<u>ASGYTFTSYG</u>ISWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGN</u>ANYAQKLQGRVTM<u>TTDTST</u>STAY<u>MELRSLRS</u> DDTAVYY<u>CARDLFP</u>TIFGVSYYYWGQGT<u>LVTVSS</u></i>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO:	ISAYSGNA

145)	
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 146)	WISAYSGNANYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSVYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSVYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 147)	D/QMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS <u>QSISGR</u> LAWYQQKPGKAPNL L <u>IYEASNLES</u> GVP <u>SRFS</u> SGSGT <u>EFTL</u> TISSLQPED <u>FATYYC</u> <u>QQSY</u> <u>STPRVTF</u> GQGT <u>KVEIK</u> R <u>TAAAAPS</u> V <u>FIFPPS</u> D <u>EQLKSGT</u> A <u>SVVCLLN</u> N <u>FYPREAKVQW</u> KVDNA <u>LQSGNSQ</u> EV <u>TEQDSKD</u> ST <u>YSL</u> ST <u>TL</u> LS KADYEKHKLYACEVTH <u>QGLSSP</u> V <u>TKSFNR</u> GEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 148)	D/QMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS <u>QSISGR</u> LAWYQQKPGKAPNL L <u>IYEASNLES</u> GVP <u>SRFS</u> SGSGT <u>EFTL</u> TISSLQPED <u>FATYYC</u> <u>QQSY</u> <u>STPRVTF</u> GQGT <u>KVEIK</u>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 22)	QQSYSTPRVT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A01

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 149)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFT <u>SYG</u> <u>ISWVRQAPGQG</u> LEWMG <u>WISAYGGSTNYA</u> QKL <u>QGRVTM</u> TTDTSTSTAY <u>MELRS</u> LRS DDTA <u>VYYCAR</u> <u>DLFPTIFGVSVYYY</u> WGQGT <u>LVTVSS</u> ASTKGPSVFPL APSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYS <u>LSSVTV</u> P <u>SSSLGT</u> QTYICNVNH <u>KPSNTKV</u> DKKVEPKS CDK <u>HTCP</u> PCPAE <u>LLGGPSVFL</u> PPPKD <u>TLMI</u> SR <u>TP</u> EV <u>TCVVWD</u> VSH <u>EDPEVKFNWY</u> VDGVEVHN <u>AKTP</u> REE <u>QYNSTYRV</u> SVLTVH QDWLNG <u>KEYKCKVSN</u> KAL <u>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL</u> PPSRD ELTKN <u>QVSL</u> CLVK <u>GFYPSDIA</u> VEWESNGQ <u>PENNYK</u> TP <u>VLDSD</u> GSFFLYSKL <u>TVDKSRW</u> QQGNV <u>FSCSVMHEALHNHYTQ</u> KSLSLSPG
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 150)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGY <u>PFTSYG</u> <u>ISWVRQAPGQG</u> LEWMG <u>WISAYGGSTNYA</u> QKL <u>QGRVTM</u> TTDTSTSTAY <u>MELRS</u> LRS DDTA <u>VYYCAR</u> <u>DLFPTIFGVSVYYY</u> WGQGT <u>LVTVSS</u>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 102)	GYPFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS

HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 135)	ISAYGGST
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 136)	WISAYGGSTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSY YYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSY YYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 151)	D/QM/TQSPS/TLSASV/RDRV/I/T <u>CRA/SQ/SIGNR/LA/WYQ/HKPGKAPKL</u> <u>L/I/YEASTSET/GVPSRFSGSGSGTDFTLT/ISSLQPEDFATYYCQQSY</u> <u>STPYT/FGQGTKE/I/KRTAAAAPS/VIFPPSDEQLKSGTASVVCLNN</u> FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSK ADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 152)	D/QM/TQSPS/TLSASV/RDRV/I/T <u>CRA/SQ/SIGNR/LA/WYQ/HKPGKAPKL</u> <u>L/I/YEASTSET/GVPSRFSGSGSGTDFTLT/ISSLQPEDFATYYCQQSY</u> <u>STPYT/FGQGTKE/I/K</u>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 103)	QSIGNR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 15)	RASQSIGNRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 16)	EASTSET
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A02

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 153)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFT <u>SYG/SWVRQAPGQG</u> <u>LEWMG/WI/SAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCAR<u>DLFPTIFGVSYYYYYWGQGT</u>LVTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVWD VSHEDEXVKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAGQPREPVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 154)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYPFT <u>SYG/SWVRQAPGQG</u> <u>LEWMG/WI/SAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCAR<u>DLFPTIFGVSYYYYYWGQGT</u>LVTVSS</u>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 102)	GYPFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS

1)	
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 111)	ISAYSGGT
HCDR2 (AA) Kabat) (SEQ ID NO: 18)	WISAYSGGNTYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSY YYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSY YYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 155)	DIQMTQSPSTLSASVRDRVII <u>TCRASQSIGNRLA</u> WYQHKGKAPKL LIYE <u>EASTSETGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>STPYTFGQGTKLEIK</u> RRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSK ADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 156)	DIQMTQSPSTLSASVRDRVII <u>TCRASQSIGNRLA</u> WYQHKGKAPKL LIYE <u>EASTSETGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYYC <u>QQSY</u> <u>STPYTFGQGTKLEIK</u>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 103)	QSIGNR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 15)	RASQSIGNRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 16)	EASTSET
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A03

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 157)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFT <u>SYG</u> /SWVRQAPGQG LEWMG <u>WISAYSGNANYAQKLQGRVTM</u> TTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCAR <u>DLFPTIFGVSY</u> YYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDLMISRTPEVTCVVWD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 158)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYPFT <u>SYG</u> /SWVRQAPGQG LEWMG <u>WISAYSGNANYAQKLQGRVTM</u> TTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCAR <u>DLFPTIFGVSY</u> YYYYWGQGTLTVSS
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 102)	GYPFTSYG

HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 145)	ISAYSGNA
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 146)	WISAYSGNANYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSVYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSVYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 159)	<u>D/QMTQSPSTLSASVRDRVII</u> <u>TCRASQSIGNRLA</u> WYQHKGKAPKL <u>LIE</u> <u>EASTSETGVPSRFSGSGSGTDFLT</u> <u>TISSLQPEDFATYYCQQSY</u>
	<u>STPYTFGQGTKEIK</u> RRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNN FYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSK ADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 160)	<u>D/QMTQSPSTLSASVRDRVII</u> <u>TCRASQSIGNRLA</u> WYQHKGKAPKL <u>LIE</u> <u>EASTSETGVPSRFSGSGSGTDFLT</u> <u>TISSLQPEDFATYYCQQSY</u> <u>STPYTFGQGTKEIK</u>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 103)	QSIGNR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 15)	RASQSIGNRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 71)	EAS
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 16)	EASTSET
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 17)	QQSYSTPYT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A10

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 161)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFT <u>SYG</u> <u>I</u> SWVRQAPGQG LEWMG <u>W</u> <u>I</u> SAYGGSTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCAR <u>DLFPTIFGVSVYYY</u> WGQGT <u>L</u> TVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVWD VSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 162)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFT <u>SYG</u> <u>I</u> SWVRQAPGQG LEWMG <u>W</u> <u>I</u> SAYGGSTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCAR <u>DLFPTIFGVSVYYY</u> WGQGT <u>L</u> TVSS

HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 135)	ISAYGGST
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 136)	WISAYGGSTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVYYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVYYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 163)	D/QMTQSPTLSASVGDRVITC <u>RASQS/SGR</u> LAWYQQKPGKAPNL LI <u>EASNLES</u> GVP <u>SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC</u> <u>QQSY</u> <u>SWPRTFGQGTKVEIK</u> RTAAAAPS <u>VIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN</u> NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ <u>QDSKDSTYSLSSTTLS</u> KADYEHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 164)	D/QMTQSPTLSASVGDRVITC <u>RASQS/SGR</u> LAWYQQKPGKAPNL LI <u>EASNLES</u> GVP <u>SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC</u> <u>QQSY</u> <u>SWPRTFGQGTKVEIK</u>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSI <u>SGR</u>
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RAS <u>QSI</u> <u>SGRLA</u>
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 106)	EAS <u>N</u>
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EAS <u>N</u> LES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 21)	QQSY <u>SWPRT</u>
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 21)	QQSY <u>SWPRT</u>

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A11

(Este clon es el mismo que G1AA/G12v2, pero sin la mutación LALA).

5

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 165)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVS <u>CASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG</u> LEWMG <u>WISAYGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVYYYYW</u> GQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSSVTV <u>PSSSLGTQTYICNVN</u> HKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPKD <u>TLMISRTPEVTCVWD</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN <u>AKTPREEQYN</u> STYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
--	---

AA del dominio VH (SEQ ID NO: 29)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQG LEWMGWI<u>SAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLSR</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYYWGQGTLTVSS</u></i>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 111)	ISAYSGGT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 18)	WISAYSGGTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSVYYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSVYYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 166)	<i>D/QMTQSPTLSASVGDRVITC<u>RASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL</u> <u>LIYEASNLESGVPSRFSGSNSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY</u> <u>SWPRTFGQGTKVEIK</u></i>
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 167)	<i>D/QMTQSPTLSASVGDRVITC<u>RASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL</u> <u>LIYEASNLESGVPSRFSGSNSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQSY</u> <u>SWPRTFGQGTKVEIK</u></i>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 106)	EASN
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 21)	QQSYSWPRT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 21)	QQSYSWPRT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A12

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 168)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTSYG/ISWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGNANYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAL LQSSGLYSLSSVTVPSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPETCVVWD VSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 169)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTSYG/ISWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGNANYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS</u> <u>DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSS</u></i>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 145)	ISAYSGNA
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 146)	WISAYSGNANYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSYWW
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSYWW
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 170)	<i>D/QMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQS/<u>SGRLAWYQQKPGKAPNL</u> <u>LIEASNL</u>ESGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSY</u> <u>SWPRTFGQGTKVEIK</u>RTAAAAPSVFIPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEKHLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 171)	<i>D/QMTQSPSTLSASVGDRVITCRASQS/<u>SGRLAWYQQKPGKAPNL</u> <u>LIEASNL</u>ESGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC<u>QQSY</u> <u>SWPRTFGQGTKVEIK</u></i>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSIAGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSI
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 106)	EASN
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 21)	QQSYSWPRT
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 21)	QQSYSWPRT

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A04

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 172)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQGLEWMGWIISAYGGSTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPDKTMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 173)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQGLEWMGWIISAYGGSTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGTLTVSS</i>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 135)	ISAYGGST
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 136)	WISAYGGSTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSYWW
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSYWW
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 174)	<i>DIQMTQSPTLSASVGDRVITCRASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL LIYEASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSQPDDFATYYCQQAN TFPRVSFGGGTKVEIKRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNN</i>
	<i>NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</i>
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 175)	<i>DIQMTQSPTLSASVGDRVITCRASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL LIYEASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSQPDDFATYYCQQAN TFPRVSFGGGTKVEIK</i>
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 106)	EASN
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 24)	QQANTFPRVS
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 24)	QQANTFPRVS

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A05

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 176)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYCAR<u>DLFPTIFGVSYYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL</u> APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 177)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMG<u>WISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS</u> DDTAVYYCAR<u>DLFPTIFGVSYYYYWGQGTLTVSS</u>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 111)	ISAYSGGT
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 18)	WISAYSGGTNYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSYYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSYYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 178)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITC<u>RASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL</u> <u>LIYEASNL</u>ESGVPSRFSGGTEFLTINSLQPDDFATYYCQQAN TFFPRVSFGGGTKVEIK RTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEKHKLACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 179)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITC<u>RASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL</u> <u>LIYEASNL</u>ESGVPSRFSGGTEFLTINSLQPDDFATYYCQQAN TFFPRVSFGGGTKVEIK
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 106)	EASN
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 24)	QQANTFPRVS
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 24)	QQANTFPRVS

Secuencia de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras, dominios variables y CDR de G1/929_01_A06

AA de la cadena pesada (sin LALA) (SEQ ID NO: 180)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGNANYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</i>
AA del dominio VH (SEQ ID NO: 181)	<i>EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGNANYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSVYYYWGQGTLTVSS</i>
HCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 94)	GYTFTSYG
HCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 1)	SYGIS
HCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 145)	ISAYSGNA
HCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 146)	WISAYSGNANYAQKLQG
HCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 69)	ARDLFPTIFGVSVYYY
HCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 3)	DLFPTIFGVSVYYY
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 182)	<i>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISGRLA</i> WYQQKPGKAPNL <i>LIYEASNL</i> ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSLQPDDFATYYC <i>QQAN</i> <i>TFPRVS</i> FGGGTKVEIKRTAAAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLS KADYEKHKLACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
AA del dominio VL (SEQ ID NO: 183)	<i>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISGRLA</i> WYQQKPGKAPNL <i>LIYEASNL</i> ESGVPSRFSGSGSGTEFTLTINSLQPDDFATYYC <i>QQAN</i> <i>TFPRVS</i> FGGGTKVEIK
LCDR1 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 100)	QSIISGR
LCDR1 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 19)	RASQSISGRLA
LCDR2 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 106)	EASN
LCDR2 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 20)	EASNLES
LCDR3 (AA) (IMGT) (SEQ ID NO: 24)	QQANTFPRVS
LCDR3 (AA) (Kabat) (SEQ ID NO: 24)	QQANTFPRVS

mAb ensayados en formato mAb²

Notas:

- 5 i. En la secuencia de la cadena pesada, el dominio variable en cursiva y, cuando sea aplicable, la localización de la mutación LALA en negrita y subrayada.
- ii. En la secuencia de la cadena ligera, el dominio variable se muestra en cursiva.
- 10 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del mAb² FS22-172-003AA/E05v2

AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 89)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGT/LTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE<u>AAGGPSVFLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVVWD</u> VSHEDPEVKFNWYDGVEVHN AKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESENQQPENNYKTP DSDGSFFLYSKLT VGADR WLEG NVFS CSVM HEAL HNHY TQK SLSL SPG
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 90)	D/QMTQSPTLSASVGDRV T/TCRASQS/SGRLAWYQQKPGKAPNL LIYEASNLES GVPSRFSGSGTEFTLT/SSLQPEDFATYYCQQSYS TPRVTFGQGT KVE/KRTVAAPS VIFPPSDEQL KSGTASVV CLNNF YPREAKV QW/KVDNA LQSGNS QESV TEQDS KDST YSL SST TLSKA DYEKH KHYACE VTHQGL SSPV TKSFNR GEC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del mAb² FS22-172-003AA/E12v2

AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 85)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFTSYG/SWVRQAPGQG LEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLFPTIFGVSYWWGQGT/LTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPE<u>AAGGPSVFLFPPKPDKTLMSRTPEVTCVVWD</u> VSHEDPEVKFNWYDGVEVHN AKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESENQQPENNYKTP DSDGSFFLYSKLT VGADR WLEG NVFS CSVM HEAL HNHY TQK SLSL SPG
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 86)	D/QMTQSPTLSASVRDRV T/TCRASQS/GNRLAWYQHKPGKAPKL LIYEASTSETGVPSRFSGSGSGTDFTLT/SSLQPEDFATYYCQQSYS TPYTFGQGT KLE/KRTVAAPS VIFPPSDEQL KSGTASVV CLNNF PREAKV QW/KVDNA LQSGNS QESV TEQDS KDST YSL SST TLSKA YEKH KHYACE VTHQGL SSPV TKSFNR GEC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del mAb² FS22-172-003AA/G12v2

AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 87)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQQ LEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLFPTIFGVYYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVWD</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVGADRWELEGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 88)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISGRLAWYQQKPGKAPNL LIYEASNLESGVPSRFSGSQSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQSYS WPRTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFRGECA

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del mAb² FS22-172-003AA/lambdav3

AA de la cadena pesada (con LALA) (SEQ ID NO: 91)	EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQQ LEWMGWISAYSGGTNYAQKLQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLFPTIFGVYYYYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPBV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPCPAPE <u>AAGGPSVFLFPPKPDKTLMISRTPEVTCVVWD</u> VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELPYIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVGADRWELEGNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG
AA de la cadena ligera (SEQ ID NO: 92)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQFPGKA PKLMIFEVTNRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCS SFKRGSTLVVFGGTKLTVLGQPAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVENTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYL SLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Secuencias de aminoácidos de antígenos recombinantes

PD-L1-rCd4-His

10

Péptido señal (subrayado)

Dominio extracelular de PD-L1 (fuente regular)

15

CD4 de rata C-terminal (dominios 3 y 4) (cursiva)

Unión entre antígeno y fusión C-terminal que codifica un sitio de restricción NotI (negrita y subrayado)

Etiqueta de hexahistidina C-terminal (cursiva y subrayada)

Humano (SEQ ID NO: 79)	<u>MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQ</u> LDLAALIVYWE <u>MEDKNIIQFVHGEEDLKQHQSSYRQRARLLKDQLS</u> LGNAALQITDVKLQDA <u>G</u> VRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQ RILVVD <u>PVTSEHELTCAEGYPKAEV</u> WTSSDHQVLSGKTTTNSK REEKLFNVTSTLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAH PPNERT <u>AAAT</u> S/TAYKSEGESA <u>EFSFPLNLGEESLQGELRWKA</u> EKA PSSQS <u>WITFS</u> LKNQKVSVQKSTS <u>NPKFQLSETPLTLQIPQVSLQFA</u> GSGNL <u>TLDRGILYQE</u> VNLVV <u>MKVTP</u> Q <u>PD</u> SNT <u>LC</u> EVMGPTSPKM RLIKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGEEVKMDSK <u>I</u> QVLSKGLNGSHHHHHH
Ratón (SEQ ID NO: 81)	<u>MRIFAGIIFTACCHLLRAFT</u> ITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVEREL DLLALVYYWEKEDEQV <u>IQFVHGEEDLKQHQSNFRGRASLPKDQLL</u> KGNAALQITDVKLQDA <u>G</u> VCCISYGGADYKRITVKVNAPYR <u>KINQRI</u> SVDPATSEHELICQAEGY <u>PEAEV</u> IWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTE GMLLNV <u>TSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELI</u> IPELPATH PPQNRT <u>AAAT</u> S/TAYKSEGESA <u>EFSFPLNLGEESLQGELRWKA</u> EK APSSQS <u>WITFS</u> LKNQKVSVQKSTS <u>NPKFQLSETPLTLQIPQVSLQF</u> AGSGNL <u>TLDRGILYQE</u> VNLVV <u>MKVTP</u> Q <u>PD</u> SNT <u>LC</u> EVMGPTSPK MRLIKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGEEVKMDS K <u>I</u> QVLSKGLNGSHHHHHH
Cyno (SEQ ID NO: 184)	<u>MRIFAVFIFTYWHLLNAFTVTPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQ</u> DL <u>TS</u> LIVYWE <u>MEDKNIIQFVHGEEDLKQHQSNRQRA</u> QLLKDQLS <u>L</u> GNAALR <u>ITDVKLQDA</u> G <u>VRCMISYGGADYKRITVKVNAPY</u> N <u>KINQRI</u> LVVDP <u>VTSEHELTCAEGYPKAEV</u> WTSSDHQVLSGKTTTNSK <u>RE</u> EKLLNV <u>TSTLRINTTANEIFYCF</u> RRLDPEENHTAELVIPELPLALPPN ERT <u>AAAT</u> S/TAYKSEGESA <u>EFSFPLNLGEESLQGELRWKA</u> EKA <u>KAPSS</u> QSWIT <u>FS</u> LKNQKVSVQKSTS <u>NPKFQLSETPLTLQIPQVSLQFAGS</u> GNL <u>TLDRGILYQE</u> VNLVV <u>MKVTP</u> Q <u>PD</u> SNT <u>LC</u> EVMGPTSPK <u>MRLI</u> LKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGEEVKMDSK <u>IQV</u> LSKGLNGSHHHHHH

5

PD-L1-Fc-His

Péptido señal (subrayado)

10 Dominio extracelular de PD-L1 (fuente regular)

Fc de IgG1 humana (cursiva)

Unión entre antígeno y fusión C-terminal que codifica un sitio de restricción NotI (negrita y subrayado)

15

Etiqueta de hexahistidina C-terminal (cursiva y subrayada)

Humano (SEQ ID NO: 80)	<u>MRIFAVFIFMTYWHILLNAFTVTPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQ</u> LDLAALIVVWEMEDKNIIQFVHGEEDLKQHQSSYRQRARLLKDQLS LGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQ RILVVDPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSQDHQVLSGKTTTNSK REEKLFNVTSTLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAH PPNERTAAADKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMisRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPKGKGSHHHHHH
Ratón (SEQ ID NO: 82)	<u>MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVEREL</u> DLLALVWYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPKQHSNFRGRASLPKDQLL KGNAALQITDVKLQDAGVYCCISYGGADYKRITLKVNAPYRKINQRI SVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTE GMLLNVTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQ PPQNRTAAADKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMisRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPKGKGSHHHHHH

PD-L1

Dominio extracelular (cursiva)

5

Dominios transmembrana e intracelulares (negrita)

Humano (SEQ ID NO: 83)	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVWEMEDKNII QFVHGEEDLKQHQSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAG VYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCA EGYPKAEVIWTSQDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTNE EIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTHILVILGAILLC VALTFIFRLRKGRMMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET
Ratón (SEQ ID NO: 84)	FTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLAVVYWEKEDEQV IQFVAGEEDLKPKQHSNFRGRASLPKDQLLKQNAALQITDVKLQDAG VYCCISYGGADYKRITLKVNAPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEG YPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTVLQVNTAN DVFYCTFWRSQPGQNHTAELIIPELPATHPPQNRTHWVLLGSILLF LIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKRNNDTQFEET

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma capaz de unirse específicamente a PD-L1, que comprende un sitio de unión a antígeno que comprende el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo G1AA/E12v2 de las SEQ ID NO: 27 y 28, respectivamente.
- 5
2. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según la reivindicación 1, en donde la molécula de anticuerpo comprende la cadena pesada y/o la cadena ligera del anticuerpo G1AA/E12v2 de las SEQ ID NO: 47 y 48, respectivamente.
- 10
3. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según la reivindicación 1 o 2, en donde:
- 15
- (i) la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma es una molécula multiespecífica, preferiblemente biespecífica, que comprende al menos un segundo sitio de unión a antígeno;
- 20
- (ii) la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma comprende un segundo sitio de unión a antígeno localizado en un dominio constante de la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma; y/o
- 25
- (iii) el segundo sitio de unión a antígeno comprende:
- 30
- (a) una primera secuencia en el bucle estructural AB y/o una segunda secuencia en el bucle estructural EF de un dominio pesado constante,
 - (b) una primera secuencia en el bucle estructural AB y una segunda secuencia en el bucle estructural EF de un dominio pesado constante,
 - (c) una primera secuencia en el bucle estructural AB y/o una segunda secuencia en el bucle estructural EF y/o una tercera secuencia en el bucle estructural CD de un dominio pesado constante, o
 - (d) una primera secuencia en el bucle estructural AB, una segunda secuencia en el bucle estructural EF y una tercera secuencia en el bucle estructural CD de un dominio pesado constante;
- 35
- opcionalmente, en donde el dominio constante de la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma definido en (ii), o el dominio pesado constante de la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma definido en (iii), es un dominio CH3.
- 40
4. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de anticuerpo es una inmunoglobulina G (IgG), o fragmento de unión a antígeno de la misma, opcionalmente en donde:
- 45
- (i) la molécula de anticuerpo es una IgG1 o fragmento de la misma, o una IgG4 o fragmento de la misma; y/o
 - (ii) la molécula de anticuerpo es una IgG1 o fragmento de la misma con una región Fc modificada;
- 50
- opcionalmente además en donde:
- (a) la molécula de anticuerpo es una IgG1 o fragmento de la misma con una región Fc modificada con función efectora inmune reducida;
 - (b) el Fc modificado tiene ADCC y/o CDC reducida con respecto a IgG1;
- 55
- (c) la región Fc modificada comprende una modificación LALA, LALA-PA o LALA-PG; y/o
 - (d) la molécula de anticuerpo es una IgG1 o fragmento de unión a antígeno de la misma que comprende una modificación LALA en la región Fc.
- 60
5. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según la reivindicación 3 o 4, en donde:
- (a) el segundo sitio de unión a antígeno se une a una molécula inhibidora de punto de control, molécula coestimuladora o antígeno asociado a tumor; y/o
- 65
- (b)

- (i) el segundo sitio de unión a antígeno no se une a OX40, al coestimulador inducible de células T (ICOS) o a CD137;
- 5 (ii) el segundo sitio de unión a antígeno no se une a CD27 o proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR); o
- (iii) el segundo sitio de unión al antígeno no se une al gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3).
- 10 6. La molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cadena pesada comprende un resto de lisina adicional (K) en el extremo C de la secuencia del dominio CH3 de la cadena pesada.
- 15 7. Un conjugado o fusión que comprende la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un modulador del sistema inmunitario (agonista o antagonista), una molécula citotóxica o un radioisótomo.
- 20 8. Una molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico que codifican la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el conjugado o fusión según la reivindicación 7 que comprende la molécula de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un modulador del sistema inmunitario o una molécula citotóxica.
- 25 9. Una molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico según la reivindicación 8, en donde la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico comprende una secuencia de ADNc que codifica una o más de los VH y VL; el Fab; la cadena pesada; y la cadena ligera del anticuerpo G1AA/E12v2.
- 30 10. La molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico según la reivindicación 9, en donde la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico comprende una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ADNc de VH que codifica el VH del anticuerpo G1AA/E12v2 de la SEQ ID NO: 27 y la segunda secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ADNc de VL que codifica el VL del anticuerpo G1AA/E12v2 de la SEQ ID NO: 28.
- 35 11. Un vector o conjunto de vectores que comprende la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.
- 40 12. Una célula huésped recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico o conjunto de moléculas de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, o el vector o conjunto de vectores según la reivindicación 11.
- 45 13. Un método para producir la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de la misma, conjugado o fusión según cualquier reivindicación precedente, que comprende cultivar la célula huésped recombinante de la reivindicación 12 en condiciones adecuadas para la producción de la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado o fusión;
- 50 opcionalmente, que comprende además aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, conjugado o fusión.
- 55 14. Una composición, por ejemplo, composición farmacéutica, que comprende la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de la misma, conjugado o fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un excipiente, por ejemplo, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 60 15. La molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de la misma, conjugado o fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición según la reivindicación 14, para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia; opcionalmente, en donde el método comprende administrar la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de la misma, conjugado, fusión o composición al cuerpo humano o animal en combinación con un segundo agente terapéutico, opcionalmente, en donde el segundo agente terapéutico es una radioterapia, preferiblemente radioterapia dirigida.
- 65 16. Un método *in vitro* de detección o diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un individuo, comprendiendo el método el uso de la molécula de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de la misma, conjugado o fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición según la reivindicación 14, en donde el método se practica en una muestra obtenida del individuo.

DIBUJOS

Figura 1

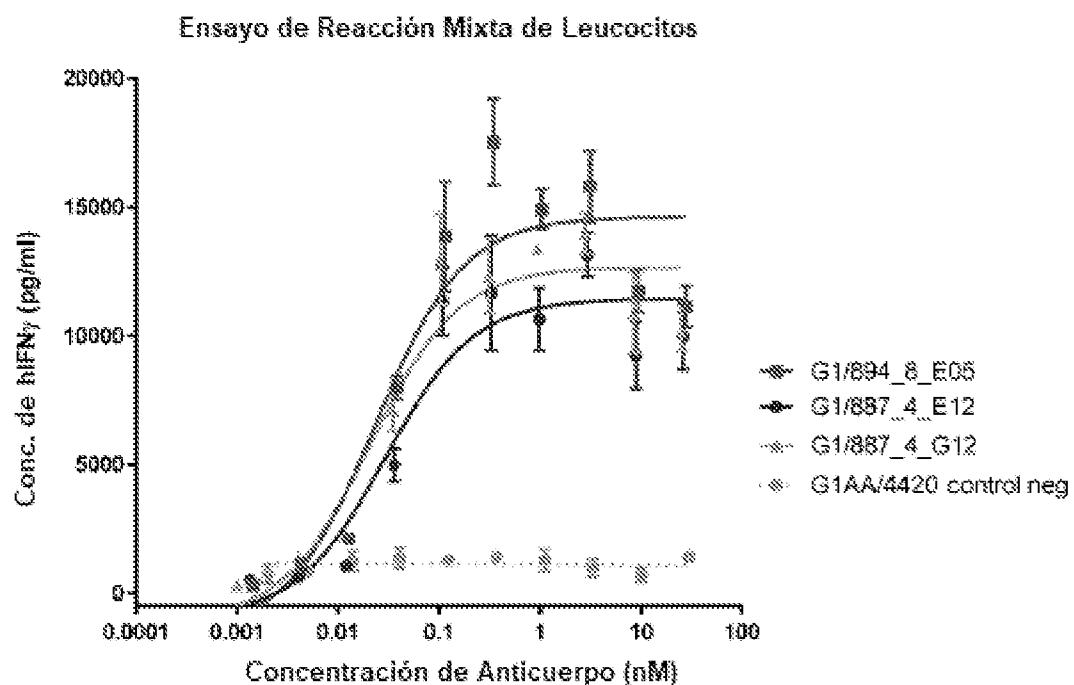


Figura 2

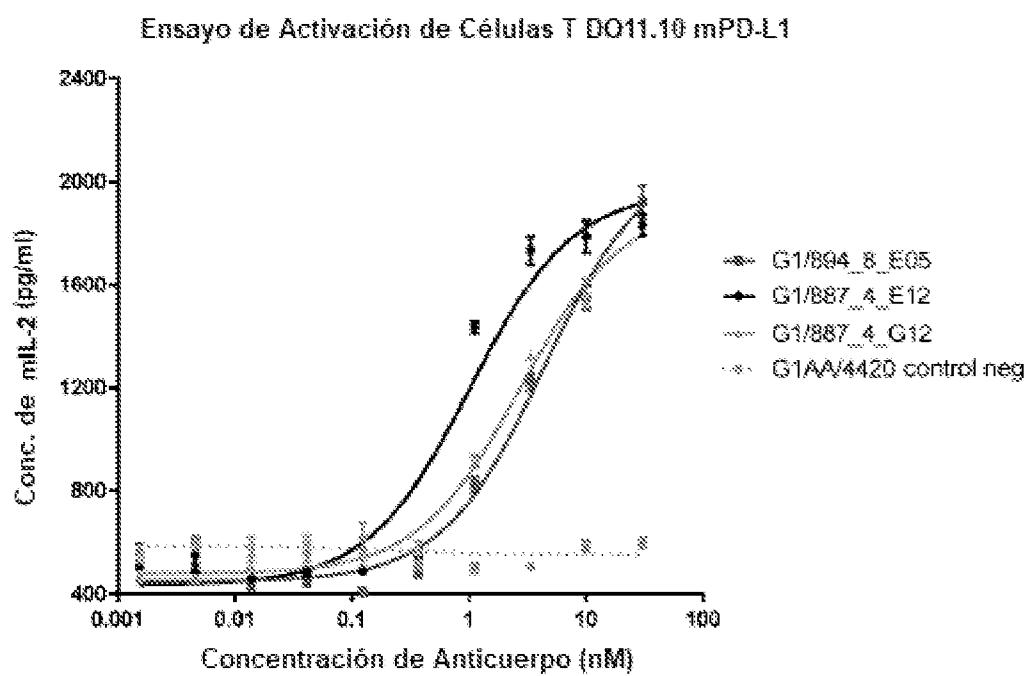


Figura 3

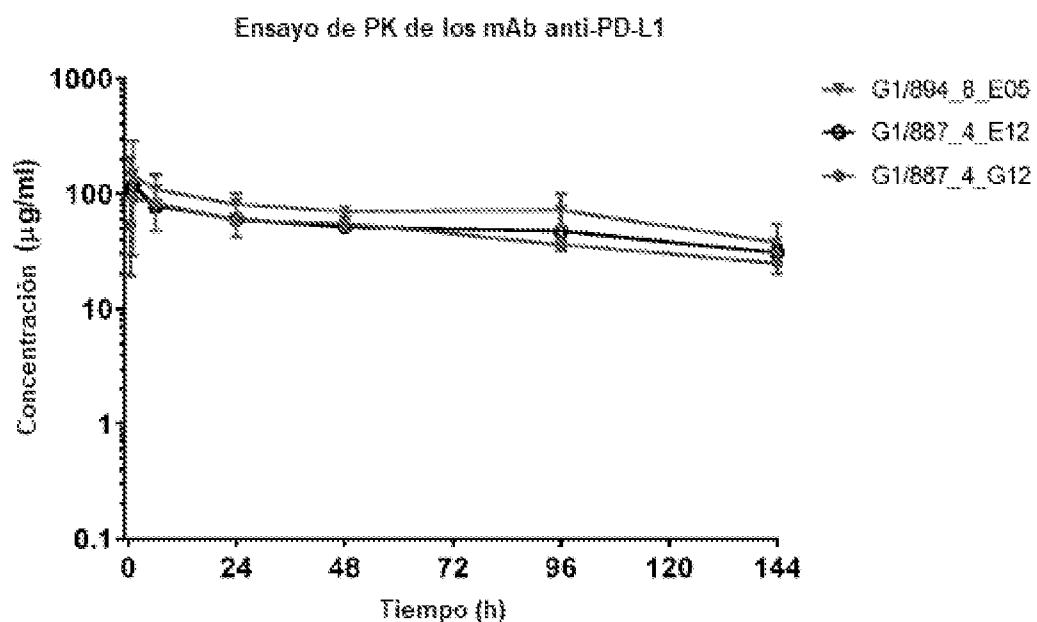


Figura 4

