

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 006 183**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (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/EP2019/068793**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.01.2020 WO20011964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2019 E 19740347 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024 EP 3820569**

54 Título: **Moléculas de anticuerpo que se unen a PD-L1 y CD137**

30 Prioridad:

12.07.2018 GB 201811405

09.11.2018 GB 201818283

26.02.2019 GB 201902594

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2025

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:

**LAKINS, MATTHEW;
MUNOZ-OLAYA, JOSE;
WOLLERTON, FRANCISCA;
BATEY, SARAH;
TUNA, MIHRIBAN y
KOERS, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 3 006 183 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 que se unen a PD-L1 y CD137

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpo que se unen tanto a PD-L1 como a CD137 y son capaces de inducir agonismo de CD137. Las moléculas de anticuerpo comprenden un sitio de unión basado en CDR para PD-L1, y un sitio de unión a antígeno CD137 que está localizado en un dominio constante de la molécula de anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo de la invención encuentran aplicación, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades, tales como cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La muerte celular programada 1 (PD-1) y sus ligandos PD-L1 (CD274, B7-H1) y PD-L2 (B7-DC) suministran señales inhibitoras 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. PD-L1 es un miembro de la familia de 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.

15 PD-L1 se une a su receptor PD-1 con una afinidad (K_D) de 770 nM. PD-1 se expresa en células T activadas, células B y células mieloides, y modula la activación o inhibición de respuestas inmunitarias celulares. La unión de PD-L1 a PD-1 suministra una señal inhibitora, reduciendo la producción de citocinas y 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 respuestas inmunitarias crónicas durante las infecciones virales. El cáncer, como una enfermedad crónica y proinflamatoria, subvierte esta ruta protectora inmunitaria 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, el interferón gamma (IFN- γ) también regula al alza la expresión de PD-L1.

20 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 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.

25 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 la cabeza y cuello (17/54; 31 %), cuello uterino (10/34; 29 %), cáncer de origen primario desconocido (CUP; 8/29; 28 %), glioblastoma multiforme (GBM; 5/20; 25 %), vejiga (8/37; 21 %), esófago (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.

30 Los ensayos clínicos han mostrado el beneficio clínico de tomar como diana a PD-L1 en pacientes que ha dado lugar a la aprobación de tres anticuerpos monoclonales dirigidos anti-PD-L1 hasta la fecha. Atezolizumab (MPDL3280A RG7466, Tecentriq™), un anticuerpo IgG1 humanizado que se une a PD-L1 está aprobado para el tratamiento de primera línea de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y el tratamiento de primera y segunda línea de cáncer de vejiga después de que los ensayos clínicos mostraran tasas de respuesta objetiva (ORR) del 38 % y 43 %, respectivamente, en pacientes con tumores positivos para PD-L1 (Iwai *et al.*, 2017). Avelumab (MSB0010718C Bavencio™) es un anticuerpo IgG1 completamente humano que se une a PD-L1 y está aprobado para el tratamiento de carcinoma de células de Merkel y tratamiento de segunda línea de cáncer de vejiga, mientras que el anticuerpo IgG1 completamente humano durvalumab (MEDI4736, Imfinz™) está aprobado para el tratamiento de segunda línea del cáncer de vejiga. Ensayos adicionales con estos anticuerpos y otros agentes terapéuticos anti-PD-L1 están en curso centrándose en expandir la gama de cánceres sólidos que pueden ser tratados, incluyendo cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, carcinoma de cabeza y cuello, pancreático, ovárico y de células renales.

35 CD137 (4-1BB; TNFRSF9) es una molécula coestimuladora de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF). Se sabe ampliamente que CD137 está regulado al alza en las células T CD8⁺ después de la activación, y también pueden expresarse en células T auxiliares CD4⁺ activadas, células B, células T reguladoras, células asesinas naturales (NK), células T asesinas naturales (NKT) y células dendríticas (DC) (Bartkowiak y Curran, 2015). El papel funcional primario de CD137 en la potenciación de la citotoxicidad de las células T se describió por primera vez en 1997 (Shuford *et al.*, 1997) y poco después se propusieron mAb anti-CD137 como agentes terapéuticos anticancerosos.

40 CD137 es una proteína transmembrana con cuatro dominios extracelulares ricos en cisteína, denominados CRD1-4, y una región citoplasmática responsable de la señalización de CD137. El ligando para CD137 es CD137L. Aunque no existe estructura cristalina para el complejo CD137/CD137L, se predice que CD137 forma un complejo trímero/trímero

con CD137L (Won *et al.*, 2010). El acoplamiento de CD137L da como resultado la formación de trímeros de receptor y el agrupamiento posterior de múltiples trímeros de receptor, y conduce a la activación de la cascada de señalización de CD137. Esta cascada de señalización proporciona una señal de supervivencia a las células T contra la muerte celular inducida por activación (Hurtado *et al.*, 1997), desempeñando así un papel crítico en el mantenimiento de respuestas inmunitarias efectivas de las células T y generando memoria inmunológica (Bartkowiak y Curran, 2015).

CD137 se expresa por células T activadas y se ha usado como marcador para identificar células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de antígeno (Wolff *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2014). Típicamente, la expresión de CD137 es mayor en células T CD8⁺ que en células T CD4⁺ (Wen *et al.*, 2002). En el caso de las células T CD8⁺, la proliferación, supervivencia y función efectora citotóxica a través de la producción de interferón gamma e interleucina 2 se han atribuido a la reticulación de CD137. La reticulación de CD137 también contribuye a la diferenciación y mantenimiento de las células T CD8⁺ de memoria (Chacon *et al.*, 2013). En algunos subconjuntos de células T CD4⁺, la reticulación de CD137 conduce de manera similar a la proliferación y activación y da como resultado la liberación de citocinas tales como interleucina 2 (Makkouk *et al.*, 2016). También se ha demostrado que CD137 se expresa en subconjuntos reactivos con tumores de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). Se ha mostrado que la monoterapia con CD137 es eficaz en varios modelos tumorales inmunogénicos preclínicos tales como MC38, CT26 y linfomas de células B.

El desarrollo clínico de los mAAb contra CD137 ha sido lento debido a la inflamación hepática de alto grado limitante de la dosis asociada con el tratamiento con anticuerpos agonistas de CD137. Urelumab (BMS-663513), un anticuerpo de isotipo IgG4 humano que no bloquea al ligando (Chester *et al.*, 2018), fue el primer anticuerpo anti-CD137 en entrar en los ensayos clínicos, pero estos se detuvieron después de que se observara una toxicidad hepática dependiente de la dosis significativa, en la diana (Chester *et al.*, 2018; Segal *et al.*, 2017; y Segal *et al.*, 2018). Más recientemente, se recomenzaron ensayos clínicos de urelumab en el tratamiento de cánceres sólidos en donde el tratamiento con urelumab se combinó con radioterapia (NCT03431948) o con otros anticuerpos terapéuticos, tales como rituximab (NCT01775631), cetuximab (NCT02110082), anticuerpo anti-PD-1 nivolumab (NCT02253992, NCT02534506, NCT02845323) y una combinación de nivolumab y el anticuerpo anti-LAG-3 BMS986016 (NCT02658981). Sin embargo, para reducir la toxicidad hepática asociada con el tratamiento con urelumab, la dosificación de urelumab en estos ensayos tuvo que limitarse y los resultados de eficacia fueron decepcionantes (Chester *et al.*, 2018).

No se ha observado toxicidad limitante de la dosis con el anticuerpo anti-CD137 de Pfizer utomilumab (PF-050826566), un anticuerpo de isotipo IgG2 humano, en el intervalo de dosis de 0,03 mg/kg hasta 10 mg/kg en ensayos clínicos de Fase I de cáncer avanzado (Chester *et al.*, 2016; Segal *et al.*, 2018). Sin embargo, la tasa de respuesta objetiva global con este anticuerpo fue solo del 3,8 % en pacientes con tumores sólidos, lo que indica potencialmente que utomilumab tiene una potencia y eficacia clínica más débiles que urelumab, mientras que tiene un perfil de seguridad más favorable (Chester *et al.*, 2018; Segal *et al.*, 2018). Se ha ensayado utomilumab en combinación con radioterapia (NCT03217747) o quimioterapia, así como en combinación con otras terapias de anticuerpos, incluyendo el anticuerpo anti-PD-L1 avelumab (NCT02554812) y el anticuerpo anti-PD-1 pembrolizumab (NCT02179918), para evaluar la seguridad, tolerabilidad, toxicidades limitantes de dosis (DLT), dosis máxima tolerada (MTD) y eficacia de las diferentes combinaciones de tratamiento. Estos ensayos se están llevando a cabo con resultados tempranos que no muestran DLT para dosis de hasta 5 mg/kg y una tasa de respuesta del paciente del 26 % para la combinación de utomilumab y pembrolizumab. (Tolcher *et al.*, 2016) (Pérez-Ruiz *et al.*, 2017).

Se están llevando a cabo ensayos clínicos para ensayar el anticuerpo anti-CD137, utomilumab, en combinación con el anticuerpo anti-PD-L1, avelumab (NCT02554812 NCT3390296). También se están ensayando combinaciones triples de utomilumab con avelumab y otras terapias (NCT02554812 NCT03217747 NCT03440567 NCT03414658).

Varias moléculas biespecíficas dirigidas a CD137 también están en desarrollo en fase temprana, por ejemplo, aquellas dirigidas a CD137, así como a FAP-alfa (Link *et al.*, 2018; Reichen *et al.*, 2018), HER2 (Hinner *et al.*, 2015 y WO 2016/177802 A1), o EphA2 (Liu *et al.*, 2017). También se están desarrollando proteínas de fusión con CD137L que se dirigen a tumores, por ejemplo, a través de FAP-alfa (Claus *et al.*, 2017). El biespecífico de CD137 más avanzado clínicamente es PRS-343, una molécula biespecífica CD137/HER2 que ha entrado recientemente en ensayos clínicos de Fase I para el tratamiento de un rango de tumores sólidos para evaluar su seguridad, tolerabilidad y eficacia (NCT03330561).

Existen otros enfoques para combinar la actividad anti-CD137 y la actividad anti-PD-L1 en terapias biespecíficas. Un enfoque utilizó la tecnología de bionics para producir una IgG humana heterodimérica de longitud completa con unión monovalente tanto a CD137 como a PD-L1 (WO2018056821) dando como resultado una molécula que puede unirse tanto a CD137 como a PD-L1 e inducir agonismo de CD137 en presencia de altos niveles de PD-L1. Se ha descrito un segundo enfoque usando fusiones sdAb-Fc para tomar como diana tanto CD137 como PD-L1 (WO2017123650). Ambos enfoques son capaces de unirse a CD137 en ausencia de unión a PD-L1 e inducir bajos niveles de agonismo de CD137 en ausencia de PD-L1, este agonismo aumenta en presencia de altos niveles de PD-L1. Se ha descrito un anticuerpo biespecífico heterodimérico adicional con unión monovalente tanto a CD137 como a PD-L1 (WO2019/025545 A1), que contiene una región de unión anti-CD137 humanizada y una región anti-PD-L1 humana que induce agonismo de CD137 en presencia de niveles de PD-L1.

Los datos actuales muestran que el tratamiento global con monoterapia anti-PD-L1 da como resultado una respuesta en menos del 50 % de los pacientes con cáncer. 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. El bloqueo de PD-1/PD-L1 tiene una fuerte validación clínica, sin embargo, menos del 50 % de los pacientes responden en un entorno de monoterapia. Se espera que las combinaciones de PD-L1 e inmunomoduladores adicionales demuestren una eficacia mejorada. Sin embargo, tales combinaciones pueden estar ligadas a un aumento en los eventos adversos relacionados con el tratamiento y, como resultado, la eficacia puede estar restringida por la ventana terapéutica limitada. Las moléculas agonistas dirigidas a CD137 todavía tienen que demostrar respuestas significativas en pacientes con cáncer, esto puede deberse en parte a niveles de dosis relativamente bajos debido a un índice terapéutico limitado. Por tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de desarrollar tratamientos que combinen el bloqueo de PD-L1 e inciten agonismo de CD137 en terapias seguras y eficaces.

Declaraciones de la invención

Como se explicó en la sección de antecedentes anterior, el desarrollo clínico de las moléculas agonistas de CD137 se ha reprimido debido a que el tratamiento está asociado con inflamación hepática de alto grado limitante de la dosis (urelumab) o baja eficacia clínica (utomilumab).

Los presentes inventores reconocieron que hay una necesidad en la técnica de moléculas agonistas de CD137 que exhiban alta actividad y donde el agonismo pueda localizarse en el microentorno del tumor. Tales moléculas podrían administrarse a individuos a dosis que optimicen la potencia y, por tanto, la eficacia de la molécula, y podrían emplearse en el tratamiento del cáncer como agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención comprenden un sitio de unión a antígeno CD137 que está localizado en un dominio constante de la molécula de anticuerpo. Los presentes inventores realizaron un amplio programa de selección y maduración de afinidad para aislar un panel de moléculas que contienen el sitio de unión al antígeno CD137 (también denominadas "Fcab" en la presente memoria) que se unen a CD137 dímérico con una afinidad mayor que a CD137 monomérico.

"Afinidad", como se refiere en la presente memoria, puede referirse a la fuerza de la interacción de unión entre una molécula de anticuerpo y su antígeno cognado medida por K_D . Como sería fácilmente evidente para el experto en la técnica, cuando la molécula de anticuerpo es capaz de formar múltiples interacciones de unión con un antígeno (por ejemplo, cuando la molécula de anticuerpo es capaz de unirse al antígeno bivalentemente y, opcionalmente, el antígeno es dímérico) la afinidad, medida por K_D también puede verse influenciada por la avidéz, por lo que la avidéz se refiere a la fuerza total de un complejo anticuerpo-antígeno.

La expresión de CD137 por las células T se regula al alza por la activación. Sin desear estar ligado por la teoría, se cree que debido a la alta expresión de CD137 en las células T activadas, CD137 estará en forma de dímeros, trímeros y multímeros de orden superior en la superficie de tales células. Por el contrario, las células inmunitarias sin estimular, tales como las células T sin estimular, expresan niveles bajos o despreciables de CD137 en su superficie celular y, por lo tanto, es probable que cualquier CD137 presente esté en forma monomérica. Por lo tanto, se espera que las moléculas de anticuerpo que comprenden un sitio de unión al antígeno CD137 que se unen a CD137 dímérico o multimérico con alta avidéz, se unirán preferiblemente a células inmunitarias activadas, tales como células T activadas, en contraposición a células inmunitarias sin estimular, por ejemplo.

Se cree que estas características del sitio de unión al antígeno CD137 distinguen las moléculas de anticuerpo de la presente invención de anticuerpos conocidos que se unen a CD137, por ejemplo, el anticuerpo descrito en WO2018056821. WO2018056821 describe un anticuerpo que contiene un dominio de unión a CD137 monovalente que se une a CD137 con una alta afinidad (rango nM bajo, véase la Tabla 6 de WO2018056821). Puesto que estos anticuerpos no distinguen entre CD137 monomérico y dímérico o multimérico, no se espera que estos anticuerpos de la técnica anterior presenten la misma unión preferencial a células inmunitarias activadas.

Como se describe en la sección de antecedentes anterior, se cree que la ligación inicial del ligando de CD137 a CD137 inicia una cadena de eventos que conduce a la trimerización del receptor, seguido de agrupamiento del receptor, activación y posterior iniciación de una actividad potente de las células T antitumorales. Para que un agente terapéutico logre eficazmente la activación de CD137, se espera, por lo tanto, que varios monómeros de receptor necesiten estar unidos por puente entre sí de una manera que imite el enlace por el ligando trimérico.

Utomilumab es una molécula IgG2 y depende de la reticulación por los receptores Fcγ para su actividad agonista. Urelumab es una molécula IgG4 con actividad constitutiva y, por lo tanto, no requiere reticulación por receptores Fcγ para la actividad, aunque su actividad agonista se potencia tras la reticulación por algunos receptores Fcγ. Los receptores Fcγ se encuentran en todo el cuerpo humano. La actividad de activación de las células inmunitarias de utomilumab y urelumab no se limita, por lo tanto, a sitios particulares en el cuerpo y, por lo tanto, puede ocurrir en localizaciones distintas del microentorno tumoral, tal como el hígado.

Los presentes inventores han mostrado que el sitio de unión al antígeno CD137 presente en las moléculas de anticuerpo de la invención requiere la reticulación con el fin de agrupar y activar CD137. Sin embargo, debe observarse que ésta no es una característica intrínseca de los ligantes de CD137.

Más bien, muchos de los ligantes de CD137 aislados durante el programa de cribado se unieron a CD137, pero no requerían reticulación para la agrupación y activación de CD137 o indujeron agrupación y activación de CD137 limitada en ausencia de reticulación.

Como se mencionó anteriormente, la reticulación mediada por el receptor Fcγ tiene la desventaja de que los receptores Fcγ se encuentran en todo el cuerpo humano y, por lo tanto, la activación de CD137 no se limita a un sitio particular. Por lo tanto, los presentes inventores introdujeron mutaciones en el dominio CH2 de los Fcab para reducir o anular la unión al receptor Fcγ. Por tanto, en ausencia de reticulación a través de un agente distinto de los receptores Fcγ, las moléculas de anticuerpo de la invención no muestran actividad agonista de CD137. Además, se espera que estas mutaciones den como resultado que las moléculas de anticuerpo de la presente invención sean incapaces de inducir citotoxicidad celular de anticuerpos, de modo que las moléculas de anticuerpo no incitarán la destrucción de las células inmunitarias que activan.

Los presentes inventores han demostrado que las moléculas de anticuerpo que contienen el sitio de unión a antígeno CD137 descrito anteriormente y un sitio de unión basado en CDR para PD-L1 son altamente eficaces en la activación de células inmunitarias en localizaciones en donde CD137 y PD-L1 se coexpresan, por ejemplo, en un microentorno tumoral. La coexpresión en este sentido abarca situaciones en donde CD137 y PD-L1 se expresan en las mismas células, por ejemplo, una célula T, y situaciones en donde CD137 y PD-L1 se expresan en diferentes células, por ejemplo, una célula T y una célula tumoral, respectivamente.

Las moléculas de anticuerpo son capaces de unirse simultáneamente a CD137 y PD-L1. Por tanto, en localizaciones en donde PD-L1 y CD137 se coexpresan, se cree que la unión de las moléculas de anticuerpo a PD-L1 provoca la reticulación de las moléculas de anticuerpo, lo que a su vez conduce a la agrupación y activación de CD137 unido en la superficie de las células T.

Como demuestran los presentes inventores, al reducir o anular la unión al receptor Fcγ, la actividad agonista de las moléculas de anticuerpo depende de que estén presentes tanto PD-L1 como CD137. En otras palabras, la actividad agonista es condicional y, por lo tanto, se espera que las moléculas de anticuerpo sean capaces de activar únicamente células inmunitarias en localizaciones donde está presente PD-L1, tal como en el microentorno tumoral. Se espera que esta activación dirigida de células inmunitarias sea beneficiosa para evitar la inflamación hepática observada con el tratamiento con urelumab, por ejemplo.

De hecho, los presentes inventores demuestran que las moléculas de anticuerpo que tienen las características descritas anteriormente no muestran hepatotoxicidad grave cuando se administran en un modelo de ratón a dosis terapéuticas. Solo se observó una patología hepática mínima en ratones a los que se había administrado estas moléculas de anticuerpo, que no se consideró que representase la hepatotoxicidad grave que se había notificado previamente para otros anticuerpos agonistas anti-CD137. Estudios preliminares en monos cynomolgus también mostraron que las moléculas de anticuerpo son seguras y bien toleradas hasta 30 mg/kg. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se espera que los resultados de estos modelos animales se traduzcan en la clínica para predecir el riesgo de hepatotoxicidad en pacientes humanos y, por lo tanto, que las moléculas de anticuerpo de la invención tendrían un bajo riesgo de inducir hepatotoxicidad en pacientes humanos tratados a dosis terapéuticas.

Los presentes inventores también proporcionan evidencia *in vitro* de que el nivel de actividad agonista de CD137 inducida por la molécula de anticuerpo se correlaciona con la cantidad de expresión de PD-L1 en la superficie celular. Los inventores demuestran que la molécula de anticuerpo es capaz de agonizar CD137 incluso cuando hay un nivel bajo de expresión de PD-L1 y que a medida que aumenta el nivel de PD-L1 en el sistema, también lo hace la actividad agonista de CD137. Este resultado apoya además la evidencia de que la actividad agonista de CD137 depende de la expresión de PD-L1 y sugiere que las moléculas de anticuerpo de la invención tendrán un amplio rango de actividad en tumores que expresan niveles variables de PD-L1 en la superficie de las células tumorales.

Los sitios de unión basados en CDR para PD-L1 descritos anteriormente son capaces de bloquear eficazmente la unión de PD-L1 a su receptor PD-1. PD-1 se expresa en células T activadas, células B y células mieloides, y modula la activación o inhibición de respuestas inmunitarias celulares. La unión de PD-L1 a PD-1 proporciona una señal inhibitoria, reduciendo la producción de citocinas y la proliferación de células T, amortiguando de este modo la respuesta inmunitaria. En el cáncer, la interacción de PD-L1 en una célula tumoral con PD-1 en una célula T reduce la actividad de las células T para evitar que el sistema inmunitario ataque las células tumorales. Por lo tanto, se espera que mediante el bloqueo de la unión de PD-L1 a PD-1, las moléculas de anticuerpo de la invención puedan evitar que las células tumorales evadan el sistema inmunitario de esta manera. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que este bloqueo eficaz de la unión de PD-L1 a PD-1 funciona junto con la actividad agonista de CD137 descrita anteriormente para aumentar la potencia antitumoral de la molécula de anticuerpo.

Los presentes inventores también han mostrado que tales moléculas de anticuerpo biespecíficas que comprenden el sitio de unión al antígeno CD137 y el sitio de unión basado en CDR para PD-L1 descrito anteriormente pueden suprimir el crecimiento tumoral *in vivo*. Además, se observó una supresión del crecimiento tumoral más eficaz con las moléculas de anticuerpo biespecíficas en comparación con una combinación de dos moléculas de anticuerpo mono-específicas donde una de las moléculas de anticuerpo comprendía un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1 y la otra molécula comprendía un sitio de unión a antígeno basado en CDR para CD137, lo que demuestra que se observan

agrupamiento y señalización potenciados de CD137, y por tanto activación de las células T y efectos antitumorales correspondientes, con las moléculas de anticuerpo de la invención.

Las moléculas de anticuerpo que comprenden un sitio de unión al antígeno CD137 de la invención pueden adicionalmente ser capaces de unirse a PD-L1 bivalentemente, de manera que las moléculas de anticuerpo se unen tanto a CD137 como a PD-L1 bivalentemente. Se espera que esto sea ventajoso, ya que se espera que la unión bivalente de ambas dianas haga más estable el puente entre la célula T que expresa CD137 y la célula que expresa PD-L1 y, por lo tanto, extienda el tiempo durante el cual la célula T se localiza en sitios donde PD-L1 se coexpresa con CD137, tal como en el microentorno tumoral, y puede actuar sobre la enfermedad, por ejemplo, el tumor. Esto es diferente de la gran mayoría de los formatos de anticuerpos biespecíficos convencionales que son heterodiméricos y se unen a cada antígeno diana monovalentemente a través de un brazo Fab. Se espera que dicha interacción monovalente no solo sea menos estable, sino que también sea menos eficaz en la inducción de la agrupación de receptores de TNF tales como CD137 y/o requiera una mayor expresión de una o ambas dianas para inducir dicha agrupación y, por lo tanto, la activación de las células T. Esto está apoyado por experimentos realizados por los presentes inventores, que mostraron que las moléculas de mAb² que comprenden un sitio de unión a Fab bivalente para PD-L1 y un sitio de unión monovalente para CD137 en uno de los dominios CH3 de la molécula indujeron niveles más bajos de activación de células T, medida por la liberación de IFN- γ , que la unión de un mAb² a ambas dianas bivalentemente.

Una característica adicional de las moléculas de anticuerpo identificadas por los inventores es que el sitio de unión a antígeno para CD137 y el sitio de unión basado en CDR para PD-L1 están contenidos ambos dentro de la propia estructura del anticuerpo. En particular, las moléculas de anticuerpo no requieren que otras proteínas se fusionen a la molécula de anticuerpo a través de conectores u otros medios para dar como resultado una molécula que se une bivalentemente a ambas de sus dianas. Esto tiene una serie de ventajas. Específicamente, las moléculas de anticuerpo pueden producirse usando métodos similares a los empleados para la producción de anticuerpos convencionales, ya que no comprenden ninguna porción fusionada adicional. También se espera que la estructura dé como resultado una estabilidad mejorada del anticuerpo, ya que los conectores pueden degradarse con el tiempo, dando como resultado una población heterogénea de moléculas de anticuerpo. En tales poblaciones heterogéneas, se espera que aquellos anticuerpos en la población que tienen solo una proteína fusionada a ellos, y por tanto que se unen a una diana solo monovalentemente, no induzcan agonismo condicional de los receptores de TNF tales como CD137 tan eficientemente, como aquellos anticuerpos que tienen dos proteínas fusionadas a ellos y que por tanto son capaces de unirse a ambas dianas bivalentemente. La escisión/degradación del conector podría tener lugar antes de la administración o después de la administración del agente terapéutico al paciente (por ejemplo, a través de escisión enzimática o el pH *in vivo* del paciente), dando como resultado de este modo una reducción de su eficacia mientras circula en el paciente. Como no hay conectores en las moléculas de anticuerpo de la invención, se espera que las moléculas de anticuerpo retengan el mismo número de sitios de unión tanto antes como después de la administración. Además, la estructura de las moléculas de anticuerpo también se prefiere desde la perspectiva de la inmunogenicidad de las moléculas, ya que la introducción de proteínas fusionadas o conectores o ambos puede inducir inmunogenicidad cuando las moléculas se administran a un paciente, dando como resultado una eficacia reducida del agente terapéutico.

Así, la presente invención proporciona:

[1] Una molécula de anticuerpo que se une al ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y CD137, que comprende

(a) un sitio de unión a antígeno basado en la región determinante de la complementariedad (CDR) para PD-L1; y

(b) un sitio de unión al antígeno CD137 localizado en un dominio CH3 de la molécula de anticuerpo, en donde el sitio de unión al antígeno CD137 comprende una primera secuencia y una segunda secuencia localizadas en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3, respectivamente, en donde la primera secuencia está localizada entre las posiciones 14 y 17 del dominio CH3 y la segunda secuencia está localizada entre las posiciones 91 y 99 del dominio CH3, en donde la numeración de residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT, y

en donde la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH, el dominio VL, la primera secuencia y la segunda secuencia expuestas en:

(i) SEQ ID NO 12, 14, 113 y 114, respectivamente [FS22-172-003-AA/E12v2];

(ii) SEQ ID NO 23, 25, 113 y 114, respectivamente [FS22-172-003-AA/E05v2];

(iii) SEQ ID NO 23, 30, 113 y 114, respectivamente [FS22-172-003-AA/G12v2];

(iv) SEQ ID NO 12, 14, 79 y 80, respectivamente [FS22-053-008-AA/E12v2];

(v) SEQ ID NO 23, 25, 79 y 80, respectivamente [FS22-053-008-AA/E05v2];

(vi) SEQ ID NO 12, 14, 79 y 89, respectivamente [FS22-053-017-AA/E12v2];

(vii) SEQ ID NO **23, 25, 79 y 89**, respectivamente **[FS22-053-017-AA/E05v2]**; o

(viii) SEQ ID NO **23, 30, 79 y 89**, respectivamente **[FS22-053-017-AA/G12v2]**.

[2] La molécula de anticuerpo según [1], en donde la molécula de anticuerpo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina y/o una cadena ligera de inmunoglobulina, preferiblemente una cadena pesada de inmunoglobulina y una cadena ligera de inmunoglobulina.

[3] La molécula de anticuerpo según [1] o [2], en donde la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL expuestos en (i) o (ii).

[4] La molécula de anticuerpo según [3], en donde la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL expuestos en (i).

[5] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [4], en donde la primera secuencia está localizada en las posiciones 15, 16, 16.5, 16.4, 16.3, 16.2 y 16.1 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.

[6] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [5], en donde la segunda secuencia está localizada en las posiciones 92 a 98 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.

[7] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [6], en donde la molécula de anticuerpo comprende además una tercera secuencia localizada en el bucle estructural CD del dominio CH3.

[8] La molécula de anticuerpo según [7], en donde la tercera secuencia se localiza en las posiciones 43 a 78 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo, en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.

[9] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [7] a [8], en donde la tercera secuencia tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 73.

[10] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [9], en donde la molécula de anticuerpo comprende la secuencia del dominio CH3 expuesta en:

(i) SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]**; o

(ii) SEQ ID NO: **81 [FS22-53-008]**.

[11] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [10], en donde la primera y segunda secuencia tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO **113 y 114 [FS22-172-003]**, respectivamente.

[12] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [9] y [11], en donde la molécula de anticuerpo comprende la secuencia del dominio CH3 expuesta en la SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]**.

[13] Una molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [12], en donde la molécula de anticuerpo es una molécula de IgG1 humana.

[14] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [13], en donde la molécula de anticuerpo comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo:

(i) **FS22-172-003-AA/E12v2** expuesto en las SEQ ID NO **134 y 17**, respectivamente;

(ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** expuesto en las SEQ ID NO **137 y 28**, respectivamente;

(iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** expuesto en las SEQ ID NO **140 y 33**, respectivamente;

(iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** expuesto en las SEQ ID NO **143 y 17**, respectivamente;

(v) **FS22-053-008-AA/E05v2** expuesto en las SEQ ID NO **146 y 28**, respectivamente;

(vi) **FS22-053-017-AA/E12v2** expuesto en las SEQ ID NO **152 y 17**, respectivamente;

(vii) **FS22-053-017-AA/E05v2** expuesto en las SEQ ID NO **153 y 28**, respectivamente; o

(viii) **FS22-053-017-AA/G12v2** expuesto en las SEQ ID NO **154 y 33**, respectivamente.

[15] La molécula de anticuerpo según [14], en donde la molécula de anticuerpo comprende la cadena ligera y cadena pesada expuestas en uno cualquiera de (i) - (iv) de [14].

- [16] La molécula de anticuerpo según [14], en donde la molécula de anticuerpo comprende la cadena ligera y cadena pesada expuestas en (i) de [14].
- 5 [17] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [14] a [16], en donde la prolina (P) en la posición **114** del dominio CH2 del anticuerpo está sustituida con alanina (A), y en donde la numeración de los residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT.
- [18] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [17], en donde la molécula de anticuerpo se une a PD-L1 humano y CD137 humano.
- [19] La molécula de anticuerpo según [18], en donde el PD-L1 consiste en o comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **180**.
- 10 [20] La molécula de anticuerpo según [18] o [19], en donde el CD137 humano consiste en o comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **186**.
- [21] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [20], en donde la molécula de anticuerpo se ha modificado para reducir o anular la unión del dominio CH2 de la molécula de anticuerpo a uno más receptores Fcγ.
- 15 [22] La molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [21], en donde la molécula de anticuerpo no se une a uno más receptores Fcγ.
- [23] La molécula de anticuerpo según [21] o [22], en donde el receptor Fcγ se selecciona del grupo que consiste en: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIII.
- [24] Un conjugado que comprende la molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [23] y una molécula bioactiva.
- 20 [25] Un conjugado que comprende la molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [23] y un marcador detectable.
- [26] Una molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican la molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [23].
- 25 [27] Una molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican la molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [2], [5] a [10], [13] a [14] y [17] a [23], en donde la(s) molécula(s) de ácido nucleico comprende(n) la secuencia de ácido nucleico de cadena pesada y/o la secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de:
- (i) **FS22-172-003-AA/E12v2** expuesto en las SEQ ID NO **32** y **39**, o **135** y **136**, respectivamente, preferiblemente las SEQ ID NO **32** y **39**, respectivamente;
- (ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** expuesto en las SEQ ID NO **138** y **139**, respectivamente;
- 30 (iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** expuesto en las SEQ ID NO **141** y **142**, respectivamente;
- (iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** expuesto en las SEQ ID NO **144** y **145**, respectivamente; o
- (v) **FS22-053-008-AA/E05v2** expuesto en las SEQ ID NO **147** y **148**, respectivamente.
- [28] Un vector o vectores que comprenden la molécula o moléculas de ácido nucleico según uno cualquiera de [26] a [27].
- 35 [29] Una célula huésped recombinante que comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico según uno cualquiera de [26] a [27], o el o los vectores según [28].
- [30] Un método para producir la molécula de anticuerpo según uno cualquiera de [1] a [23] que comprende cultivar la célula huésped recombinante de [29] en condiciones para la producción de la molécula de anticuerpo.
- [31] El método según [30] que comprende además aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo.
- 40 [32] Una composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo o conjugado según uno cualquiera de [1] a [25] y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- [33] La molécula de anticuerpo o conjugado según uno cualquiera de [1] a [25] para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un individuo.
- 45 [34] La molécula de anticuerpo o conjugado para su uso según [33], en donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en: melanoma, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de estómago y tumores estromales gastrointestinales (GIST).

[35] La molécula de anticuerpo o conjugado para su uso según [33], donde el tratamiento comprende administrar la molécula de anticuerpo o conjugado al individuo en combinación con un segundo agente terapéutico.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: las Figuras 1A, B y C muestran una alineación de las secuencias de los dominios CH3 de los Fcab FS22-053, FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012, FS22-053-013, FS22-053-014, FS22-053-015, FS22-053-016, FS22-053-017, FS22-172, FS22-172-001, FS22-172-002, FS22-172-003, FS22-172-004, FS22-172-005 y FS22-172-006, así como el Fcab de tipo salvaje (WT). Se indican los números de los residuos según los sistemas de numeración IMGT, exones de IMGT (numeración consecutiva), EU y Kabat.

La **Figura 2** muestra que el mAb² de CD137/PD-L1, FS22-172-003-AA/E12v2, es capaz de unirse a células T CD4⁺ (**Figura 2A**) y CD8⁺ (**Figura 2B**) activadas. El mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, FS22-172-003-AA/E12v2, se unió a células T activadas con valores de CE₅₀ de 0,8 nM en el caso de células T CD4⁺ y 0,9 nM en el caso de células T CD8⁺. El anticuerpo anti-PD-L1 humano de control positivo (G1-AA/E12v2) mostró una afinidad muy similar al mAb² con valores de CE₅₀ de 0,8 nM para ambos tipos de células. El anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo (G1-AA/MOR7480.1) mostró una unión baja a células CD4⁺ y CD8⁺, lo que indica el bajo nivel de expresión de CD137 en estos tipos celulares.

La **Figura 3** muestra que el mAb² de CD137/PD-L1 humano, FS22-172-003-AA/E12v2, no se une a células CHO que sobreexpresan el receptor Fcγ. El mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, FS22-172-003-AA/E12v2, el anticuerpo de control positivo para la unión al receptor Fcγ, G1/4420 y el anticuerpo de control negativo para la ausencia de unión al receptor Fcγ, G1-AA/4420, se ensayaron en un ensayo de unión celular contra cinco líneas celulares diferentes de CHO que sobreexpresan el receptor Fcγ que expresan (A) FcγRIIA 131H, (B) FcγRIIA 131E, (C) FcγRIIB, (D) FcγRIIA 158F, (E) FcγRIIA 158V, así como (F) una línea celular de CHO WT usada como control negativo. El mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, que contenía la mutación LALA en la región CH2, no se unió a ninguno de los receptores Fcγ ensayados y tampoco se unió no específicamente a células CHO WT (triángulos negros cerrados). El anticuerpo de control positivo se unió a receptores Fcγ (círculos negros cerrados) y el anticuerpo de control negativo G1-AA/4420, que contenía la mutación LALA en la región CH2, no se unió a receptores Fcγ (cuadrados grises abiertos), como se esperaba.

La **Figura 4** muestra la liberación de IL-2 humana (hIL-2) en un ensayo de activación de células T CD8⁺ primarias humanas en presencia de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano o anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo G1-AA/20H4.9. Todos los mAb² ensayados dirigieron el agrupamiento de CD137 y la activación de células T CD8⁺ sólo cuando los mAb² se reticularon por células HEK que sobreexpresaban PD-L1 humano, conduciendo a la liberación de IL-2 humana. Los valores de CE₅₀ del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano fueron más pequeños que el valor de CE₅₀ del anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo, G1-AA/20H4.9 cuando se reticuló con anticuerpo secundario anti-CH2 humano (círculos negros cerrados, línea de puntos), lo que indica que se logró una activación mejorada de las células T con el mAb². Todos mostraron un aumento en la liberación de hIL-2 y hubo una mayor liberación de IL-2 (E_{máx}) con el anticuerpo de control positivo que con el mAb² anti-CD137/PD-L1 humano.

La **Figura 5** muestra la liberación de IL-2 humana (hIL-2) en un ensayo de activación de células T CD8⁺ primarias humanas en presencia de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano o anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo G1-AA/20H4.9. Todos los mAb² ensayados dirigieron el agrupamiento de CD137 y la activación de células T CD8⁺ sólo cuando los mAb² se reticularon por células MDA-MD-231 que expresan endógenamente PD-L1 humano, lo que condujo a la liberación de IL-2 humana. Los valores de CE₅₀ del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano fueron más pequeños que el valor de CE₅₀ del anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo, G1-AA/20H4.9 cuando se reticuló con anticuerpo secundario anti-CH2 humano (círculos negros cerrados, línea de puntos), lo que indica que se logró una mejor actividad con el mAb². Todos mostraron un aumento en la liberación de hIL-2 y hubo una mayor liberación de IL-2 (E_{máx}) con el anticuerpo de control positivo que con el mAb² anti-CD137/PD-L1 humano.

La **Figura 6** muestra la liberación de IL-2 humana (hIL-2) en un ensayo de activación de células T CD8⁺ primarias humanas en presencia de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano FS22-172-003-AA/E12v2 o anticuerpo anti-CD137 humano G1-AA/20H4.9 de control positivo. Todos los mAb² ensayados dirigieron el agrupamiento de CD137 y la activación de células T CD8⁺ sólo cuando los mAb² se reticularon por células HEK.hPD-L1 que comprendían al menos un 6,5 % de la población total de células HEK dando lugar a la liberación de IL-2 humana. Los valores de CE₅₀ del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano se mantuvieron similares cuando se modulaba el porcentaje de células HEK.hPD-L1 presentes en el ensayo, pero la activación máxima (E_{máx}) aumentó en relación con un porcentaje creciente de células de reticulación HEK.hPD-L1 en el ensayo. Esto indicó que se logró una mejor actividad máxima global con el mAb² cuando el 100 % de las células HEK expresan PD-L1.

La **Figura 7** muestra que los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano son capaces de activar las células T. (**A**) y (**B**): La liberación de IFN-γ en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) primarios humanos se ensayó en presencia de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano y anticuerpo de control positivo anti-PD-L1 humano G1/S70 o anticuerpo de control positivo anti-CD137 humano G1-AA/20H4.9 (reticulado con un anticuerpo anti-CH2 humano). (**A**) mAb² basado en Fcab FS22-053-008 y (**B**) mAb² basado en Fcab FS22-172-003 mostraron una actividad más alta en este ensayo que cualquiera de los anticuerpos de control positivo, lo que indica que el bloqueo de PD-L1 y el agonismo de CD137 en la misma molécula incita una mayor activación de las células T, presumiblemente a través del agrupamiento y

activación de CD137 basados en PD-L1. **(C)** Se ensayó la liberación de IFN- γ en un ensayo de MLR primarios humanos en presencia de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, anticuerpo anti-PD-L1 humano G1-AA/E12v2, anticuerpo anti-CD137 humano G1-AA/20H4.9 de control positivo (reticulado con un anticuerpo anti-CH2 humano) o Fcab anti-CD137 humano en formato de mAb² simulado (FS22-172-003-AA/D1.3). El mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 mostró una actividad de activación de células T más alta en este ensayo que cualquiera de los anticuerpos de control positivo sus Fcab componentes en formato de mAb² simulado, lo que indica que el bloqueo de PD-L1 y el agonismo de CD137 en la misma molécula incita una mayor activación de las células T, presumiblemente a través de la reticulación basada en PD-L1, lo que conduce a la agrupación y activación de CD137.

La **Figura 8** muestra la liberación de IL-2 en un ensayo de activación de células T, en donde las células T se han modificado por ingeniería para sobreexpresar CD137 de cynomolgus, en presencia de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano y anticuerpo anti-CD137 humano G1-AA/MOR7480.1 de control positivo. Todos los mAb² ensayados dirigieron la agrupación y activación de CD137 sólo cuando se reticularon con células HEK que sobreexpresaban PD-L1 de cynomolgus (símbolos negros y grises abiertos y cerrados con líneas de conexión sólidas) conduciendo a una liberación de interleucina-2 de ratón (mIL-2) en un ensayo de activación de células T DO11.10. A concentraciones crecientes, el anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo, G1-AA/MOR7480.1, que previamente habían mostrado otros que presentaba reacción cruzada con CD137 de cynomolgus, muestra un aumento en la liberación de mIL-2 (círculos negros rellenos, línea discontinua), sin embargo, la liberación máxima fue significativamente menor que la de todos los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano. Todos los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano sin células HEK que sobreexpresan PD-L1 para reticular muestran una liberación de mIL-2 significativamente menor en comparación con cuando se reticulan (datos no mostrados).

La **Figura 9** muestra la liberación de IL-2 el día 2 (**Figura 9A**) o liberación de IFN- γ el día 6 (**Figura 9B**) de células T CD4⁺ de cynomolgus⁺ cultivadas con monocitos de cynomolgus alogénicos en presencia de una titulación de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano FS22-053-008-AA/E12v2 o 172-003-AA/E12v2 o anticuerpo anti-PD-L1 humano de control positivo G1-AA/E12v2 o anticuerpo de control de isotipo G1-AA/HeID1.3.

La **Figura 10** muestra la liberación de IL-2 de ratón en un ensayo de activación de células T CD137 de ratón DO11.10 que ensaya los Fcab de CD137 de ratón y de ser humano con reactividad cruzada FS22-053-014 y FS22-053-017 en formato de mAb² simulado cuando se reticula con Proteína L. FS22-053-014 y FS22-053-017, y Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063, todos en formato de mAb² simulado HeID1.3 activaron CD137 cuando se reticulan con Proteína L conduciendo a una liberación de mIL-2. El mAb anti-CD137 de ratón de control positivo, Lob12.3, mostró un aumento en la liberación de mIL-2 como se esperaba. Todos los Fcab anti-CD137 en formato de mAb² simulado sin proteína L para reticular (líneas punteadas) mostraron una liberación de mIL-2 muy reducida en comparación con cuando se reticulan. El FS22-053-017 tuvo una menor actividad en este ensayo (una CE₅₀ 8 veces peor en comparación con FS22-053-014), pero aún mostró actividad en el ensayo.

La **Figura 11** muestra la liberación de IFN γ de ratón que es una indicación de la activación de células T CD8⁺. El mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón muestra la mayor potencia en este ensayo por encima de los anticuerpos de control positivo contra CD137 y PD-L1 humanos, o la combinación de los dos. Como se esperaba, el Fcab FS22m-063-AA en formato de mAb² simulado (FS22m-063-AA/HeID1.3) no muestra ninguna actividad.

La **Figura 12** muestra las mediciones del volumen tumoral del modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con G1-AA/4420 (control de IgG), G1/S70 (control positivo de PD-L1), G1-AA/Lob12.3 y G1/Lob12.3 (control positivo de CD137 con y sin la mutación LALA), la combinación de G1/S70 más G1-AA/Lob12.3 y FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un modelo de formato de mAb² PD-L1). Se representa el volumen tumoral medio más o menos el intervalo de confianza del 95 %. FS22m-063-AA/S70 es capaz de reducir significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con ratones tratados con control de IgG y mAb anti-PD-L1 de control positivo. La significación estadística se mostró por pares para las tasas de crecimiento a lo largo del tiempo completo del estudio usando el análisis de modelo mixto. El volumen tumoral medio se muestra como media geométrica o aritmética según sea apropiado basándose en el ensayo de normalidad de los datos. *P \leq 0,05; **P \leq 0,01; ***P \leq 0,001; ****P \leq 0,0001.

La **Figura 13** muestra los resultados de un estudio de respuesta a la dosis de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en un modelo de tumor de ratón singénico CT26. **A:** muestra las mediciones del volumen tumoral del modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con 3 dosis de G1-AA/4420 (control de IgG, 10 mg/kg), G1/Lob12.3 (control positivo de CD137, 1 mg/kg) y el mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70 a 4 dosis diferentes (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg y 10,0 mg/kg). Cada dosis se indica mediante una flecha negra vertical en el eje x. Se representa el volumen tumoral medio más o menos el intervalo de confianza del 95 %. FS22m-063-AA/S70 es capaz de reducir significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con ratones tratados con control de IgG y mAb anti-PD-L1 de control positivo. La significación estadística se mostró por pares para las tasas de crecimiento a lo largo del tiempo completo del estudio usando el análisis de modelo mixto. El volumen tumoral medio se muestra como media geométrica o aritmética según sea apropiado basándose en el ensayo de normalidad de los datos. ** P \leq 0,01; *** **** P \leq 0,0001. **B:** muestra un gráfico de Kaplan Meier del modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con 3 dosis de G1-AA/4420 (control de IgG, ~10 mg/kg) y el mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70 a 4 dosis diferentes 2 μ g, 6 μ g, 20 μ g y 200 μ g (equivalente a aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg y 10,0 mg/kg). FS22m-

063-AA/S70 induce un aumento dependiente de la dosis de la supervivencia en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con ratones tratados con control de IgG.

La **Figura 14** muestra un aumento dependiente de la dosis en la relación porcentual CD8⁺:CD4⁺ en tumor y sangre de ratones a los que se administró q2dx3 de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70 a cuatro niveles de dosis diferentes se muestra en el panel A y B la expresión de y Ki67 en células T CD8⁺ se muestra en los paneles C y D.

La **Figura 15** muestra las mediciones del volumen tumoral del modelo de tumor singénico MC38 crecido por vía subcutánea en ratones C57BL/6 tratados con G1-AA/4420 (control de isotipo), G1-AA/S70 (control positivo de PD-L1), G1-AA/Lob12.3 (control positivo de CD137), la combinación de G1-AA/S70 más G1-AA/Lob12.3 y FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un modelo de formato de mAb² PD-L1). Se representa el volumen tumoral medio [en mm³] más o menos el intervalo de confianza del 95 %. FS22m-063-AA/S70 es capaz de reducir significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico MC38 en comparación con ratones tratados con control de IgG, ratones tratados con mAb anti-PD-L1 de control positivo, ratones tratados con anti-CD137 de control positivo. La significación estadística se mostró por pares para las tasas de crecimiento a lo largo del tiempo completo del estudio usando el análisis del modelo mixto. **** $\leq 0,0001$ valor p.

La **Figura 16** muestra las mediciones del volumen tumoral del modelo de tumor singénico B16.F10 crecido por vía subcutánea en ratones C57BL/6 tratados con G1-AA/4420 (control de isotipo) y el mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70. Ambas composiciones se dosificaron a 1 mg/kg. Se representa el volumen tumoral medio [en mm³] más o menos el intervalo de confianza del 95 %. El tratamiento con FS22m-063-AA/S70 redujo significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico B16.F10 en comparación con ratones tratados con control de IgG. La significación estadística se mostró por pares para las tasas de crecimiento a lo largo del tiempo completo del estudio usando el análisis de modelo mixto. El volumen tumoral medio se muestra como media geométrica o aritmética según sea apropiado basándose en el ensayo de normalidad de los datos. *P $\leq 0,05$; **P $\leq 0,01$; ***P $\leq 0,001$; ****P $\leq 0,0001$.

La **Figura 17** muestra las representaciones de espaguetis para ratones individuales en el modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con (A) G1-AA/4420 (control de IgG), (C) G1/S70 (control positivo anti-PD-L1), (B) G1-AA/Lob12.3 y (D) G1/Lob12.3 (control positivo anti-CD137 con y sin la mutación LALA), o (E) una combinación de G1/S70 más G1-AA/Lob12.3 y (F) FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un modelo de formato de mAb² PD-L1). FS22m-063-AA/S70 indujo inhibición significativa del crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con ratones tratados con control de IgG.

La **Figura 18** muestra un gráfico de Kaplan Meier del modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con G1-AA/4420 (control de IgG), la combinación de G1/S70 más G1-AA/Lob12.3, y FS22m-063-AA/S70 (el Fcab FS22m-063 anti-CD137 de ratón en un modelo de formato de mAb² PD-L1) todos a 1 mg/kg. FS22m-063-AA/S70 indujo una supervivencia significativa en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con ratones tratados con control de IgG.

La **Figura 19** muestra las mediciones del volumen tumoral del modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con G1-AA/HeID1.3 (control de IgG), G1/S70 (control positivo anti-PD-L1), G1-AA/Lob12.3 (control positivo anti-CD137) y FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un modelo de formato de mAb² PD-L1). Se representa el volumen tumoral medio más o menos el intervalo de confianza del 95 %. El FS22m-063-AA/S70 fue capaz de reducir significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con los ratones tratados con control de IgG, los ratones tratados con mAb anti-PD-L1 de control positivo y los ratones tratados con anti-CD137 de control positivo. La significación estadística se mostró por pares para las tasas de crecimiento a lo largo del tiempo completo del estudio usando el análisis de modelo mixto. El volumen tumoral medio se muestra como media geométrica o aritmética según sea apropiado basándose en el ensayo de normalidad de los datos. *P $\leq 0,05$; **P $\leq 0,01$; ***P $\leq 0,001$; ****P $\leq 0,0001$.

La **Figura 20** muestra un gráfico de Kaplan Meier del modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con G1-AA/HeID1.3 (control de IgG), G1/S70 (control positivo anti-PD-L1), G1-AA/Lob12.3 (control positivo anti-CD137) y FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un modelo de formato de mAb² PD-L1). FS22m-063-AA/S70 induce una supervivencia significativa en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con ratones tratados con control de IgG y ratones tratados con control positivo de CD137.

La **Figura 21** muestra las representaciones de espaguetis para ratones individuales en el modelo de tumor singénico MC38 crecido por vía subcutánea en ratones C57BL/6 tratados con 3 dosis de (A) G1-AA/4420 (control de isotipo), (B) G1-AA/S70 (control positivo anti-PD-L1), (C) G1-AA/Lob12.3 (control positivo anti-CD137), (D) la combinación de G1-AA/S70 más G1-AA/Lob12.3, y (E) FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un modelo de formato de mAb² PD-L1). FS22m-063-AA/S70 induce inhibición completa del crecimiento tumoral, dando como resultado ratones sin tumor al 100 %, en un modelo de tumor singénico MC38 en comparación con ratones tratados con control de IgG.

La **Figura 22** Muestra un gráfico de Kaplan Meier del modelo de tumor singénico MC38 crecido por vía subcutánea en ratones C57BL/6 tratados con 3 dosis de G1-AA/4420 (control de isotipo), G1-AA/S70 (control positivo anti-PD-L1), G1-AA/Lob12.3 (control positivo anti-CD137), la combinación de G1-AA/S70 más G1-AA/Lob12.3, y FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un modelo de formato de mAb² PD-L1). FS22m-063-AA/S70 induce la supervivencia completa en un modelo de tumor singénico MC38 en comparación con ratones tratados con control de IgG.

La **Figura 23** Muestra las representaciones de espaguetis para ratones individuales en el modelo de tumor singénico B16.F10 crecido por vía subcutánea en ratones C57BL/6 tratados con G1-AA/4420 (control de isotipo) (**Figura 23A**) y el mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70 (**Figura 23B**). El FS22m-063-AA/S70 indujo inhibición parcial del crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico B16.F10 en comparación con ratones tratados con control de IgG.

La **Figura 24** muestra los datos de unión de mAb² anti-mCD137/PD-L1 a células T *ex vivo*, determinados por citometría de flujo. Los valores de Intensidad Fluorescente Media (MFI) se midieron a partir de anticuerpo secundario anti-Fc humano conjugado con Alexa Fluor 488 que detectó la región Fc humana del mAb² anti-mCD137/PD-L1 unido a células. Las células positivas que tenían una MFI mayor que la de una muestra de control sin teñir se identificaron como positivas para anti-mCD137/PD-L1 y los datos presentados muestran la población positiva como un porcentaje de (**A**) todas las células T CD8⁺ o (**B**) todas las células T CD4⁺ de la sangre, o (**C**) todas las células T CD8⁺ o (**D**) todas las células T CD4⁺ del tumor. Estos resultados muestran que mAb² anti-mCD137/PD-L1 se une rápidamente tanto a las células T CD8⁺ como CD4⁺ presentes tanto en el tumor como en la sangre y que el porcentaje de población de células T positivas disminuye con el tiempo dependiendo del nivel de dosis.

La **Figura 25** muestra los datos de expresión de Ki67 por las células T *ex vivo*, determinado por citometría de flujo. Los valores de intensidad fluorescente media (MFI) se midieron a partir de anticuerpo anti-Ki67 conjugado con PE-Cy7 unido a células. Las células positivas que tenían una MFI mayor que la de una muestra de control sin teñir se identificaron como positivas para la expresión de Ki67 y los datos presentados muestran la población positiva como un porcentaje de (**A**) todas las células T CD8⁺ o (**B**) todas las células T CD4⁺ de la sangre, o (**C**) todas las células T CD8⁺ o (**D**) todas las células T CD4⁺ del tumor. Estos resultados muestran que las células T en ratones dosificados con mAb² anti-mCD137/PD-L1 expresan rápidamente Ki67 tanto en células T CD8⁺ como CD4⁺ en la sangre y que un alto porcentaje de células T positivas para Ki67 ya están presentes en una muestra del microentorno tumoral. Se observó un aumento en la expresión de Ki67 con el tiempo dependiendo del nivel de dosis.

La **Figura 26** muestra la ocupación del receptor PD-L1 en relación con una muestra coincidente en el tiempo de ratones dosificados con anticuerpo de control G1-AA/4420 al que luego se le añadió mAb² anti-mCD137/PD-L1 100 nM *ex vivo* para saturar todos los receptores PD-L1, indicando así un nivel de ocupación del receptor PD-L1 del 100% (símbolos triangulares con línea discontinua). Los receptores PD-L1 libres se detectaron usando los valores de intensidad fluorescente media (MFI) de un anticuerpo anti-mPD-L1 competitivo conjugado con Bv605. Las células positivas que tenían una MFI mayor que la de una muestra de control sin teñir se identificaron como positivas para PD-L1 libre. Los resultados muestran la población positiva como un porcentaje de ocupación del receptor PD-L1 en comparación con la muestra saturada al 100 % de (**A**) células T CD8⁺ o (**B**) células T CD4⁺ de la sangre, o (**C**) células T CD8⁺ o (**D**) células T CD4⁺ del tumor. Estos resultados demuestran que la ocupación del receptor PD-L1 alcanzó el 100 % rápidamente en la sangre antes de disminuir en línea con el nivel de dosis a lo largo del tiempo. La ocupación del receptor PD-L1 en las células T se mantuvo más tiempo en el microentorno del tumor que en la sangre.

La **Figura 27** muestra el perfil farmacocinético del mAb² anti-CD137/PD-L1 a 25, 10, 3 y 1 mg/kg después de una única dosis intravenosa administrada a ratones sin tratamiento previo C57BL/6. Se muestra la concentración de mAb² CD137/PD-L1 en los ratones a lo largo del tiempo. La Figura 27 demuestra que la tasa de aclaramiento del mAb² anti-CD137/PD-L1 a cada dosis es comparable con el aclaramiento de una IgG humana convencional en ratones.

La **Figura 28** muestra que el mAb² anti-CD137/PD-L1 humano FS22-172-003-AA/E12v2 es capaz de activar las células T en un ensayo de activación de células T de PBMC usando (**A**) PBMC de mono cynomolgus o (**B**) PBMC humanas. La liberación de IFN- γ en un ensayo de PBMC se ensayó en presencia de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo G1-AA/MOR7480.1 (reticulado con un anticuerpo anti-CH2 humano). El mAb² mostró actividad en ambos ensayos y mostró niveles de activación mayores que el anticuerpo de control positivo, lo que indica que el bloqueo de PD-L1 y el agonismo de CD137 por la misma molécula incita una mayor activación de las células T, presumiblemente a través del agrupamiento y activación de CD137 basados en PD-L1, tanto en monos cynomolgus como en seres humanos.

Descripción detallada

Los aspectos y realizaciones de la presente invención se analizarán ahora con referencia a las figuras adjuntas. Serán evidentes para los expertos en la técnica aspectos y realizaciones adicionales.

La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpo que se unen tanto a PD-L1 como a CD137. Específicamente, las moléculas de anticuerpo de la presente invención comprenden un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1 y un sitio de unión a antígeno CD137 localizado en un dominio constante de la molécula

de anticuerpo. Los términos "PD-L1" y "CD137" pueden referirse a PD-L1 humano y CD137 humano, PD-L1 murino y CD137 murino, y/o PD-L1 de mono cynomolgus y CD137 de mono cynomolgus, a menos que el contexto requiera lo contrario. Preferiblemente, los términos "PD-L1" y "CD137" se refieren a PD-L1 humano y CD137 humano, a menos que el contexto requiera lo contrario.

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, preferiblemente humana. 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. La molécula de anticuerpo puede aislarse, en el sentido de estar libre de contaminantes, tales como anticuerpos capaces de unirse a otros polipéptidos y/o componentes séricos.

El término "molécula de anticuerpo", como se usa en la presente memoria, incluye por tanto fragmentos de anticuerpo, siempre que dichos fragmentos comprendan un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1 y un sitio de unión a antígeno CD137 ubicado en un dominio constante. A menos que el contexto requiera lo contrario, el término "molécula de anticuerpo", como se usa en la presente memoria, es por tanto equivalente a "molécula de anticuerpo o fragmento de la misma".

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Tales técnicas pueden implicar introducir las CDR, o regiones variables, y/o las secuencias de dominio constante que proporcionan el sitio de unión al antígeno CD137, en una inmunoglobulina diferente. La introducción de las CDR de una inmunoglobulina en otra inmunoglobulina se describe, por ejemplo, en EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Se podrían emplear técnicas similares para las secuencias relevantes del dominio constante. 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, el término "molécula de anticuerpo" debe interpretarse como que cubre 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 quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado con otro polipéptido. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos 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), Cancer Res., 56(13):3055-61).

La molécula de anticuerpo de la presente invención se une a PD-L1 y CD137. 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(s) pareja(s) de unión específica(s), en este caso PD-L1 y CD137. El término "específico" también es aplicable cuando la molécula de anticuerpo es específica para epítopos particulares, tales como epítopos en PD-L1 y CD137, 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 presentes inventores demostraron que las moléculas de anticuerpo descritas en la presente memoria mostraron un alto nivel de especificidad por PD-L1 humano y no mostraron ninguna unión significativa a otras dianas de células T de PD-L1, CD80, PD-1 o B7-H3. Véase, el **Ejemplo 9.3**. Por tanto, en una realización preferida, la molécula de anticuerpo no se une, o no muestra ninguna unión significativa, a uno cualquiera de, preferiblemente todos de, PD-L2, CD80, PD-1 y B7-H3. Los presentes inventores también demostraron que el sitio de unión al antígeno CD137 no mostrará ninguna unión significativa a los receptores de TNFRSF humanos CD40, OX40 y GITR. Véase el **Ejemplo 3.6**. Por tanto, en una realización más preferida, la molécula de anticuerpo no se une, o muestra ninguna unión significativa, a uno cualquiera de, preferiblemente todos de, PD-L2, CD80, PD-1, B7-H3, CD40, OX40 y GITR.

Los anticuerpos y métodos para su construcción y uso son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Holliger y Hudson (2005). Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar introducir CDR o regiones variables de una molécula de anticuerpo en una molécula de anticuerpo diferente (EP-A-184187, GB 2188638A y EP-A-239400).

Un sitio de unión a antígeno basado en CDR es un sitio de unión a antígeno en una región variable de anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno basado en CDR, puede estar formado por tres CDR, tales como las tres CDR de dominio variable de cadena ligera (VL) o tres CDR de dominio variable de cadena pesada (VH). Preferiblemente, el sitio de unión a antígeno basado en CDR está formado por seis CDR, tres CDR de VL y tres CDR de VH. Las contribuciones de las diferentes CDR a la unión del antígeno pueden variar en diferentes sitios de unión al antígeno.

Las tres CDR de dominio VH del sitio de unión a antígeno pueden localizarse dentro de un dominio VH de inmunoglobulina y las tres CDR de dominio VL pueden localizarse dentro de un dominio VL de inmunoglobulina. Por ejemplo, el sitio de unión a antígeno basado en CDR puede localizarse en una región variable de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo tiene uno o preferiblemente más de uno, por ejemplo, dos, sitios de unión a antígeno basados en CDR para el primer antígeno. La molécula de anticuerpo comprende así un dominio VH y un dominio VL, pero comprende preferiblemente dos dominios VH y dos dominios VL, es decir, dos pares de dominios VH/VL, como es el caso en moléculas de IgG de origen natural, por ejemplo.

- 5 El sitio de unión a antígeno basado en CDR comprende las tres CDR de VH y las tres CDR de VL, del anticuerpo **E12v2**, **E05v2**, o **G12v2**, preferiblemente **E12v2**.

Las secuencias de dominio VH y VL de estos anticuerpos se exponen como sigue:

(i) las secuencias de dominio VH y VL para el anticuerpo **E12v2** se muestran en las SEQ ID NO **12** y **14**, respectivamente;

- 10 (ii) las secuencias de dominio VH y VL para el anticuerpo **E05v2** se muestran en las SEQ ID NO **23** y **25**, respectivamente; y

(iii) las secuencias de dominio VH y VL para el anticuerpo **G12v2** se muestran en las SEQ ID NO **23** y **30**, respectivamente.

- 15 El experto no tendría dificultad para determinar las secuencias de las CDR a partir de las secuencias de dominio VH y VL de los anticuerpos expuestos anteriormente. Las secuencias de CDR pueden, por ejemplo, determinarse según Kabat (Kabat, E.A. *et al.* (1991). *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, publicación del NIH no 91-3242. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos) o el sistema de información internacional ImMunoGeneTics (IMGT: Lefranc, M.-P. *et al. Nucleic Acids Res.* 43, D413-22 (2015)).

- 20 Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VH de la molécula de anticuerpo según la numeración de Kabat pueden ser las secuencias en las posiciones localizadas 31-35, 50-65 y 95-102 del dominio VH, respectivamente.

Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VH de la molécula de anticuerpo según la numeración de IMGT pueden ser las secuencias localizadas en las posiciones 27-38, 56-65 y 105-117, del dominio VH de la molécula de anticuerpo, respectivamente.

- 25 Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VL de la molécula de anticuerpo según la numeración de Kabat pueden ser las secuencias en las posiciones localizadas 24-34, 50-56 y 89-97 del dominio VL, respectivamente.

Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VL de la molécula de anticuerpo según la numeración de IMGT pueden ser las secuencias localizadas en las posiciones 27-38, 56-65 y 105-117, del dominio VL, respectivamente.

- 30 La molécula de anticuerpo comprende la secuencia de la CDR1 del dominio VH de **SYGIS** (SEQ ID NO: **1**), CDR2 del dominio VH de **WISAYSGGTNYAQKLQG** (SEQ ID NO: **2**), y CDR3 del dominio VH de **DLFPTIFGVSYYYY** (SEQ ID NO: **3**) en donde las secuencias de CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat.

La molécula de anticuerpo comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VH de:

(i) SEQ ID NO **7**, **8** y **9**, respectivamente [**E12v2**]; o

(ii) SEQ ID NO **21**, **8** y **9**, respectivamente [**E05v2** o **G12v2**],

en donde las secuencias de CDR se definen según el esquema de numeración de IMGT.

- 35 Las CDR del dominio VH están flanqueadas por secuencias marco (FW) (HFW1, HFW2, HFW3 y HFW4). El dominio VH comprende las secuencias de HFW1, HFW2, HFW3 y HFW4 de las SEQ ID NO: **55**, **56**, **57** y **54**, respectivamente, en donde las secuencias de FW y CDR se definen según el esquema de numeración de IMGT.

- 40 Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende la CDR1 del dominio VL de **RASQSIGNRLA** (SEQ ID NO: **4**), la CDR2 de VL de **EASTSET** (SEQ ID NO: **5**), y la CDR3 de VL de **QQSYSTPYT** (SEQ ID NO: **6**), en donde las secuencias de CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat. El dominio VL se deriva de un dominio VL kappa. Cada una de las CDR del dominio VL está flanqueada por secuencias marco (FW) (LFW1, LFW2, LFW3 y LFW4) que se derivan de un dominio VL kappa. Específicamente, el dominio VL puede comprender las secuencias de LFW1, LFW2, LFW3 y LFW4 de las SEQ ID NO: **58**, **59**, **60** y **61**, respectivamente, en donde las secuencias de FW se definen según el esquema de numeración de Kabat.

- 45 La molécula de anticuerpo puede comprender la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VL de:

(i) SEQ ID NO **4**, **5** y **6**, respectivamente [**E12v2**];

(ii) SEQ ID NO **18**, **19** y **20**, respectivamente [**E05v2**]; o

(iii) SEQ ID NO **18**, **19** y **29**, respectivamente [**G12v2**],

en donde las secuencias de CDR se definen según el esquema de numeración de Kabat.

Preferiblemente, la molécula de anticuerpo comprende la secuencia de la CDR1 del dominio VL de **QSIGNR** (SEQ ID NO: **10**), la CDR2 de VL de **EAS** (SEQ ID NO: **11**), y la CDR3 de VL de **QQSYSTPYT** (SEQ ID NO: **6**), en donde las secuencias de CDR se definen según el esquema de numeración de IMGT. El dominio VL se deriva de un dominio VL kappa. Cada una de las CDR del dominio VL puede estar flanqueada por secuencias marco (FW) (LFW1, LFW2, LFW3 y LFW4) que se derivan de un dominio VL kappa. Específicamente, el dominio VL puede comprender las secuencias de LFW1, LFW2, LFW3 y LFW4 de las SEQ ID NO: **62**, **63**, **64** y **61**, respectivamente, en donde las secuencias de FW se definen según el esquema de numeración de IMGT.

La molécula de anticuerpo comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio VL de:

- (i) SEQ ID NO **10**, **11** y **6**, respectivamente [**E12v2**];
- (ii) SEQ ID NO **22**, **11** y **20**, respectivamente [**E05v2**]; o
- (iii) SEQ ID NO **22**, **11** y **29**, respectivamente [**G12v2**],

en donde las secuencias de CDR se definen según el esquema de numeración de IMGT.

El sitio de unión a antígeno basado en CDR comprende los dominios VH y VL del anticuerpo **E12v2**, **E05v2**, o **G12v2**, preferiblemente **E12v2** o **E05v2**, más preferiblemente **E12v2**.

El dominio VH de los anticuerpos **E12v2**, **E05v2**, y **G12v2** tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO **12**, **23**, y **23**, respectivamente. El dominio VL de los anticuerpos **E12v2**, **E05v2**, y **G12v2** tiene la secuencia expuesta en las SEQ ID NO **14**, **25**, y **30**, respectivamente.

La molécula de anticuerpo de la invención comprende un sitio de unión al antígeno CD137 localizado en el dominio CH3. El sitio de unión al antígeno CD137 comprende dos o más bucles estructurales modificados en un dominio CH3 de la molécula de anticuerpo. La modificación por ingeniería de bucles estructurales de dominio constante de anticuerpo para crear sitios de unión a antígeno para antígenos diana se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en Wozniak-Knopp G *et al.* (2010); WO2006/072620 y WO2009/132876.

El sitio de unión al antígeno CD137 de la molécula de anticuerpo comprende una primera y segunda secuencia, en donde la primera y segunda secuencia se localizan en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3, de la molécula de anticuerpo, respectivamente.

Los residuos en las posiciones 95 y 96 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo son de tipo salvaje, es decir, son arginina (R) y triptófano (W), respectivamente. Ambos de estos residuos están localizados en el bucle estructural de EF. Las posiciones de los residuos de aminoácidos se numeran en la presente memoria según el esquema de numeración de ImMunoGeneTics (IMGT), a menos que se indique lo contrario. El esquema de numeración de IMGT se describe en Lefranc *et al.*, 2005.

La primera secuencia comprende la secuencia PPY (SEQ ID NO: **78**).

La secuencia PPY está localizada entre las posiciones 15 y 17 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo. En una realización preferida, la secuencia PPY está localizada en las posiciones 16, 16.5 y 16.4 del dominio CH3. Alternativamente, la secuencia PPY puede estar localizada entre las posiciones 16 y 17 del dominio CH3. En una realización preferida alternativa, la secuencia PPY está localizada en las posiciones 16.3, 16.2 y 16.1 del dominio CH3. En el esquema de numeración de IMGT, los residuos insertados se numeran según la dirección del bucle en donde están localizados. Si el bucle "sube" los residuos insertados adoptan el número del residuo inmediatamente anterior a la inserción, indicándose el número del residuo insertado en la secuencia mediante un número decimal ascendente, por ejemplo 16, 16.1, 16.2, 16.3, en donde hay tres mutaciones después del residuo 16. Si el bucle "desciende", los residuos insertados adoptan el número del residuo inmediatamente anterior a la inserción, indicándose el número del residuo insertado en la secuencia mediante un número decimal descendente, por ejemplo 16, 16, 3, 16, 2, 16, 1, en donde de nuevo hay tres mutaciones después del resto 16 (LeFranc *et al.*, 2005, y LeFranc *et al.*, 2015).

El bucle estructural AB comprende una inserción de aminoácidos. La inserción tiene una longitud de 5 aminoácidos.

La inserción está localizada entre las posiciones 16 y 17 del dominio CH3 de la molécula del anticuerpo. La inserción está localizada en las posiciones 16.5 a 16.1 del dominio CH3 de la molécula del anticuerpo. La **Figura 1** muestra Fcab que comprenden un dominio CH3 en donde la inserción está localizada en las posiciones 16.5 a 16.1 del dominio CH3.

La mayoría de los Fcab identificados después de la maduración de afinidad comprendían un residuo de leucina (L) en la posición 97 del dominio CH3. Muchos de estos Fcab también comprendían un residuo de ácido aspártico (D) o un residuo de ácido glutámico (E) en las posiciones 98 del dominio CH3. Ambos cambios de estos aminoácidos están localizados en el bucle estructural de EF. Estos resultados sugieren que uno ambos de estos residuos pueden ser importantes para la unión a CD137. Por tanto, la segunda secuencia comprende la secuencia LE, en donde la

secuencia LE está localizada en las posiciones 97 y 98 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo.

La primera secuencia y la segunda secuencia pueden ser una primera y una segunda secuencia del dominio CH3 de: **FS22-053-008**, o **FS22-053-017**, preferiblemente un miembro de unión específica **FS22-053-008**.

5 La primera secuencia y la segunda secuencia son una primera y una segunda secuencia del dominio CH3 de: **FS22-053-008**, **FS22-053-017**, o **FS22-172-003**, preferiblemente **FS22-053-008** o **FS22-172-003**, más preferiblemente **FS22-172-003**.

La secuencia del dominio CH3 de **FS22-053-008**, **FS22-053-017**, y **FS22-172-003** se expone en las SEQ ID NO: **81**, **90** y **115**, respectivamente.

10 La primera y segunda secuencia de **FS22-053-008**, **FS22-053-017** y **FS22-172-003** es la secuencia entre las posiciones 14 y 17 y las posiciones 91 y 99 del dominio CH3 de **FS22-053-008**, **FS22-053-017** y **FS22-172-003**, respectivamente.

Alternativamente, la primera y segunda secuencia de **FS22-053-008** puede ser la secuencia entre las posiciones 14 y 17 y las posiciones 92 y 99 del dominio CH3 de **FS22-053-008**.

15 La secuencia del bucle CD de la molécula de anticuerpo está preferiblemente sin modificar, es decir, de tipo salvaje. Por lo tanto, la secuencia del bucle CD tiene preferiblemente la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **73**. La secuencia del bucle CD está localizada preferiblemente en las posiciones 43 a 78 del dominio CH3.

20 La primera y segunda secuencias pueden ser las secuencias completas del bucle estructural AB y EF, de **FS22-053-008**, **FS22-053-017** o **FS22-172-003**, respectivamente. La determinación de la localización de los bucles estructurales AB, CD y EF en una secuencia del dominio CH3, por ejemplo, según los sistemas de numeración IMGT, exones de IMGT, EU o Kabat, está dentro de las capacidades del experto en la técnica y se describe en Hasenhindl *et al.*, (2013). En una realización preferida, los bucles estructurales AB, CD y EF según el sistema de numeración IMGT están localizados entre las posiciones 10 y 19, 42 y 79, y 91 y 102 del dominio CH3, respectivamente. En una realización preferida, la primera, segunda y tercera secuencia son por lo tanto la secuencia entre las posiciones 10 y 19, 42 y 79, y 91 y 102 del dominio CH3 de **FS22-053-008**, **FS22-053-017** o **FS22-172-003**, respectivamente.

25 Por tanto, en una realización preferida, la primera y segunda secuencia del sitio de unión al antígeno CD137 comprenden la secuencia del bucle AB y EF expuesta en las SEQ ID NO **171** y **172** [**FS22-172-003**], respectivamente, o la secuencia del bucle estructural AB y EF expuesta en las SEQ ID NO **173** y **174** [**FS22-53-008**], respectivamente. En una realización más preferida, la primera y segunda secuencia del sitio de unión al antígeno CD137 comprende el bucle estructural AB y EF expuesto en las SEQ ID NO **171** y **172** [**FS22-172-003**], respectivamente.

30 En una realización preferida alternativamente, la primera y segunda secuencia del sitio de unión al antígeno CD137 comprende la secuencia del bucle estructural AB y EF expuesta en las SEQ ID NO **173** y **175** [**FS22-053-017**], respectivamente.

El sitio de unión al antígeno CD137 comprende la primera y segunda secuencia expuestas en:

(i) SEQ ID NO 79 y 80, respectivamente [**FS22-053-008**];

35 (ii) SEQ ID NO 79 y 89, respectivamente [**FS22-053-017**]; o

(iii) SEQ ID NO 113 y 114, respectivamente [**FS22-172-003**]; en donde la primera y la segunda secuencia están localizadas entre las posiciones 14 y 17, y 91 y 99 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo, respectivamente.

40 En una realización preferida, el sitio de unión al antígeno CD137 de la molécula de anticuerpo comprende la primera y segunda secuencia expuestas en las SEQ ID NO **113** y **114** [**FS22-172-003**], respectivamente, o la primera y segunda secuencia expuestas en las SEQ ID NO **79** y **80** [**FS22-53-008**], respectivamente. En una realización aún más preferida, el sitio de unión al antígeno CD137 de la molécula de anticuerpo comprende la primera y segunda secuencia expuestas en las SEQ ID NO **113** y **114** [**FS22-172-003**], respectivamente. Por ejemplo, el sitio de unión al antígeno CD137 puede comprender las secuencias del bucle estructural AB y EF expuestas en las SEQ ID NO **171** y **172** [**FS22-172-003**], respectivamente.

45 Como alternativa a la numeración de IMGT, las posiciones de los residuos de aminoácidos, incluyendo la posición de las secuencias de aminoácidos, sustituciones, deleciones e inserciones como se describe en la presente memoria, pueden numerarse según la numeración de exones de IMGT (también denominada numeración consecutiva), numeración de EU o numeración de Kabat. La concordancia entre la numeración de IMGT, la numeración de exones de IMGT, la numeración de EU y la numeración de Kabat de las posiciones de los residuos del dominio CH3 se muestran en la **Figura 1**. Así, por ejemplo, cuando la presente solicitud se refiere a que la primera secuencia está localizada entre las posiciones 14 y 17 del dominio CH3 del clon, respectivamente, cuando las posiciones de los residuos están numeradas según el esquema de numeración de IMGT, la primera secuencia está localizada entre las posiciones 18 y 21 del dominio CH3, donde las posiciones de los residuos están numeradas según el esquema de numeración de exones de IMGT, como se muestra en la **Figura 1**. Alternativamente, la posición de los residuos de

aminoácidos en el dominio CH3, incluyendo la posición de las secuencias de aminoácidos, sustituciones, deleciones e inserciones en el dominio CH3, como se describe en la presente memoria, puede definirse por referencia a su posición en la secuencia del dominio CH3 de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID NO: **75**. La concordancia entre la numeración de IMGT y la secuencia del dominio CH3 de tipo salvaje también se muestra en la **Figura 1**.

- 5 En una realización, la molécula de anticuerpo comprende un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia del dominio CH3 de **FS22-053-008**, **FS22-053-017**, o **FS22-172-003**, en donde la secuencia del dominio CH3 de **FS22-053-008**, **FS22-053-017** y **FS22-172-003** se expone en las SEQ ID NO **81**, **90** y **115**, respectivamente.

- 10 En una realización preferida, la molécula de anticuerpo comprende un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia del dominio CH3 de **FS22-172-003** o **FS22-053-008** expuestas en las SEQ ID NO **115** y **81**, respectivamente. En una realización más preferida, la molécula de anticuerpo comprende un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia del dominio CH3 de **FS22-172-003** expuesta en la SEQ ID NO **115**.

En una realización alternativamente preferida, la molécula de anticuerpo comprende un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia del dominio CH3 de **FS22-053-017** expuesto en la SEQ ID NO **90**, respectivamente.

- 15 El dominio CH3 de la molécula de anticuerpo puede comprender opcionalmente un residuo de lisina (K) adicional en el extremo C-terminal inmediato de la secuencia del dominio CH3.

Además, la molécula de anticuerpo de la invención puede comprender un dominio CH2 de una molécula de inmunoglobulina G, tal como un dominio CH2 de una molécula de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la invención comprende un dominio CH2 de una molécula de IgG1. El dominio CH2 puede tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **76**.

- 20 Se sabe que el dominio CH2 se une a receptores Fcγ y complemento. La unión del dominio CH2 a los receptores Fcγ se requiere para la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), mientras que la unión al complemento se requiere para la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). 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 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 ligado por la teoría, se espera que esto reduzca o evite la toxicidad 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, donde se debería 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 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 del dominio CH2 por alanina (L1.3A y L1.2A).
- 35 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 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 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.
- 40

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

- 45 (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;

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:

- 50 (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.

Por ejemplo, el dominio CH2 puede tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **77**.

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;
- (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.

Por ejemplo, el dominio CH2 puede tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **176**.

En una realización preferida, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende

- (a) un dominio VH y un dominio VL que comprenden el sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1; y
- (b) un sitio de unión al antígeno CD137 localizado en un dominio CH3 de la molécula de anticuerpo;

en donde el dominio VH y VL comprende, tiene o consiste en el VH y VL del anticuerpo **E12v2**, **E05v2**, o **G12v2**, preferiblemente **E12v2**; y

en donde el sitio de unión al antígeno CD137 comprende una primera secuencia y una segunda secuencia localizadas en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3, respectivamente; en donde la primera y segunda secuencia tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: **113** y **114** [**FS22-172-003**], o **79** y **80** [**FS22-53-008**], respectivamente, preferiblemente en donde la primera y segunda secuencia tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO **113** y **114** [**FS22-172-003**], con la condición de que la molécula de anticuerpo no comprenda el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo **G12v2** emparejado con el sitio de unión al antígeno CD137 que tiene la primera y segunda secuencia expuestas en las SEQ ID NO **79** y **80** [**FS22-053-008**].

Como se describe en los Ejemplos, una molécula de anticuerpo que tiene un sitio de unión al antígeno CD137 que comprende la primera secuencia y una segunda secuencia expuestas en las SEQ ID NO: **79** y **89**, respectivamente [**FS22-053-017**] fue capaz de unirse a CD137 humano, de cynomolgus e, inesperadamente, de ratón. Los inventores demostraron que esta molécula de anticuerpo tenía actividad en los ensayos de activación de células T humanas, de cynomolgus y de ratón cuando se reticuló.

En una realización alternativamente preferida, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende

- (a) un dominio VH y un dominio VL que comprenden el sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1; y
- (b) un sitio de unión al antígeno CD137 localizado en un dominio CH3 de la molécula de anticuerpo;

en donde el dominio VH y VL consiste en el VH y VL del anticuerpo **E12v2**, **E05v2**, o **G12v2**, preferiblemente **E12v2**; y

en donde el sitio de unión al antígeno CD137 comprende una primera secuencia y una segunda secuencia localizadas en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3, respectivamente, en donde la primera y segunda secuencia tienen la secuencia expuesta en las SEQ ID NO: **79** y **89** [**FS22-053-017**].

En una realización preferida, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende

- (a) un dominio VH y un dominio VL que comprenden el sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1; y
- (b) un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en las SEQ ID NO **115** [**FS22-172-003**], u **81** [**FS22-53-008**], preferiblemente la SEQ ID NO **115** [**FS22-172-003**];

en donde el dominio VH y VL consiste en el VH y VL del anticuerpo **E12v2**, **E05v2**, o **G12v2**, preferiblemente **E12v2**, con la condición de que la molécula de anticuerpo no comprenda el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo **G12v2** emparejado con el dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **81** [**FS22-53-008**].

En una realización aún más preferida alternativamente, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende

- (a) un dominio VH y un dominio VL que comprenden el sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1; y

(b) un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **90** [**FS22-053-017**];

en donde el dominio VH y VL comprende, tiene o consiste en el VH y VL del anticuerpo **E12v2**, **E05v2**, o **G12v2**, preferiblemente **E12v2**.

- 5 En una realización preferida adicional, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende
- (a) un dominio VH y un dominio VL que comprenden el sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1;
 - (b) un dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en las SEQ ID NO **115** [**FS22-172-003**], u **81** [**FS22-53-008**], preferiblemente la SEQ ID NO **115** [**FS22-172-003**];
- 10 (c) un dominio CH2 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **76**, en donde el dominio CH2 comprende:
- (i) un residuo alanina en la posición 1.3;
 - (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; y

- 15 en donde el dominio VH y VL comprende, tiene o consiste en el VH y VL del anticuerpo **E12v2**, **E05v2**, o **G12v2**, preferiblemente **E12v2**, con la condición de que la molécula de anticuerpo no comprenda el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo **G12v2** emparejado con el dominio CH3 que comprende, tiene o consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID NO: **81** [**FS22-53-008**].

En una realización adicional, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137, comprende:

- 20 (a) un dominio VH y VL que comprende un sitio de unión a antígeno basado en CDR para PD-L1, en donde el sitio de unión a antígeno basado en CDR comprende las CDR 1-6; y
- (b) un sitio de unión al antígeno CD137 localizado en un dominio CH3 de la molécula de anticuerpo, comprendiendo el sitio de unión al antígeno CD137 una primera secuencia y una segunda secuencia localizada en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3;
- 25 en donde el dominio VH, el dominio VL, la primera secuencia y la segunda secuencia tienen la secuencia expuesta en:
- (i) SEQ ID NO **12**, **14**, **113** y **114**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/E12v2**];
 - (ii) SEQ ID NO **23**, **25**, **113** y **114**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/E05v2**];
 - (iii) SEQ ID NO **23**, **30**, **113** y **114**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/G12v2**];
- 30 (iv) SEQ ID NO **12**, **14**, **79** y **80**, respectivamente [**FS22-053-008-AA/E12v2**]; o
- (v) SEQ ID NO **23**, **25**, **79** y **80**, respectivamente [**FS22-053-008-AA/E05v2**]; o

en donde el dominio VH, el dominio VL y el dominio CH3 tienen la secuencia expuesta en:

- (i) SEQ ID NO **12**, **14**, y **115**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/E12v2**];
 - (ii) SEQ ID NO **23**, **25**, y **115**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/E05v2**];
- 35 (iii) SEQ ID NO **23**, **30**, y **115**, respectivamente [**FS22-172-003-AA/G12v2**];
- (iv) SEQ ID NO **12**, **14**, y **81**, respectivamente [**FS22-053-008-AA/E12v2**]; o
 - (v) SEQ ID NO **23**, **25**, y **81**, respectivamente [**FS22-053-008-AA/E05v2**].

En una realización preferida adicional, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende una cadena pesada que comprende, tiene o consiste en la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo:

- 40 (i) **FS22-172-003-AA/E12v2** expuestas en las SEQ ID NO **134** y **17**, respectivamente;
- (ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** expuesta en las SEQ ID NO **137** y **28**, respectivamente;
- (iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** expuesta en las SEQ ID NO **140** y **33**, respectivamente;

- (iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** expuesta en las SEQ ID NO **143** y **17**, respectivamente; o
- (v) **FS22-053-008-AA/E05v2** expuesta en las SEQ ID NO **146** y **28**, respectivamente.

En una realización incluso más preferida, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende una cadena pesada que comprende, tiene o consiste en la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo:

- 5 (i) **FS22-172-003-AA/E12v2** expuesta en las SEQ ID NO **134** y **17**, respectivamente;
- (ii) **FS22-172-003-AA/E05v2** expuesta en las SEQ ID NO **137** y **28**, respectivamente;
- (iii) **FS22-172-003-AA/G12v2** expuesta en las SEQ ID NO **140** y **33**, respectivamente;
- (iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** expuesta en las SEQ ID NO **143** y **17**, respectivamente; o
- (v) **FS22-053-008-AA/E05v2** expuesta en las SEQ ID NO **146** y **28**, respectivamente.

- 10 En una realización aún más preferida, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende una cadena pesada que comprende, tiene o consiste en la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo:

- (i) **FS22-172-003-AA/E12v2** expuesta en las SEQ ID NO **134** y **17**, respectivamente; o
- (iv) **FS22-053-008-AA/E12v2** expuesta en las SEQ ID NO **143** y **17**, respectivamente.

- 15 En una realización aún más preferida, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende una cadena pesada que comprende, tiene o consiste en la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo **FS22-172-003-AA/E12v2** expuesta en las SEQ ID NO **134** y **17**, respectivamente.

En una realización más adicional preferida alternativamente, la molécula de anticuerpo que se une a PD-L1 y CD137 comprende una cadena pesada que comprende, tiene o consiste en la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo:

- 20 (i) **FS22-053-017-AA/E12v2** expuesta en las SEQ ID NO **152** y **17**, respectivamente;
- (ii) **FS22-053-017-AA/E05v2** expuesta en las SEQ ID NO **153** y **28**, respectivamente; o
- (iii) **FS22-053-017-AA/G12v2** expuesta en las SEQ ID NO **154** y **33**, respectivamente.

- 25 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención también pueden comprender variantes de una tercera secuencia, secuencia de bucle estructural AB, CD o EF, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, secuencias de cadena ligera y/o cadena pesada descritas en la presente memoria. Las variantes adecuadas pueden obtenerse por medio de métodos de alteración de la secuencia, o mutación, y cribado. En una realización preferida, una molécula de anticuerpo que comprende una o más secuencias variantes retiene una o más de las características funcionales de la molécula de anticuerpo parental, tal como especificidad de unión y/o afinidad de unión por PD-L1 y CD137. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo que comprende una o más secuencias variantes se une preferiblemente a PD-L1 y/o CD137 con la misma afinidad, o una afinidad mayor, que la molécula de anticuerpo (parental). La molécula de anticuerpo parental es una molécula de anticuerpo que no comprende la o las sustituciones), deleciones y/o inserciones de aminoácidos que se han incorporado en la molécula de anticuerpo variante.
- 30

- 35 Por ejemplo, una molécula de anticuerpo de la invención puede comprender una tercera secuencia, secuencia de bucle estructural de AB, CD o EF, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, secuencia de cadena ligera y/o cadena pesada que tiene al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con una secuencia de bucle estructural, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, cadena ligera o cadena pesada divulgada en la presente memoria.
- 40

- 45 En una realización preferida, la molécula de anticuerpo de la invención comprende una secuencia del dominio CH3 que tiene al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 %, o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia del dominio CH3 expuesta en la SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]** u **81 [FS22-053-008]**, preferiblemente la SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]**.

- 50 En una realización preferida adicional, la molécula de anticuerpo tiene o comprende una secuencia del dominio CH2, que tiene al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 % o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia con la secuencia del dominio CH2 expuesta en la SEQ ID NO: **76** o **77**.

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), FASTA (que usa el método de Pearson y Lipman, 1988), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman, 1981), o el programa TBLASTN, de Altschul *et al.*, 1990, *supra*, empleando generalmente parámetros por defecto. En particular, puede usarse el algoritmo psi-Blast (Altschul *et al.*, 1997).

Una molécula de anticuerpo de la invención también puede comprender una tercera secuencia, secuencia de bucle estructural AB, CD o EF, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, cadena ligera y/o cadena pesada que tiene una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), por ejemplo, 20 alteraciones o menos, 15 alteraciones o menos, 10 alteraciones o menos, 5 alteraciones o menos, 4 alteraciones o menos, 3 alteraciones o menos, 2 alteraciones o menos, o 1 alteración en comparación con una tercera secuencia, secuencia de bucle estructural AB, CD o EF, dominio CH3, dominio CH2, dominio CH2 y CH3, secuencia de cadena ligera o cadena pesada divulgada en la presente memoria. En particular, pueden realizarse alteraciones en una o más regiones marco de la molécula de anticuerpo fuera de las secuencias de dominio VH y VL y/o en una o más regiones marco del dominio CH3. Por ejemplo, las alteraciones pueden estar en el dominio CH3 fuera de las secuencias descritas en la presente memoria como una primera, segunda y tercera secuencias, o como secuencias de los bucles estructurales AB, CD o EF.

En una realización preferida, la molécula de anticuerpo de la invención puede comprender una secuencia del dominio CH3 con una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), preferiblemente 20 alteraciones o menos, 15 alteraciones o menos, 10 alteraciones o menos, 5 alteraciones o menos, 4 alteraciones o menos, 3 alteraciones o menos, 2 alteraciones o menos, o 1 alteración en comparación con la secuencia del dominio CH3 expuesta en las SEQ ID NO **81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 115, 118, 121, 124, 127, 130, o 132**. En una realización más preferida, la molécula de anticuerpo de la invención puede comprender una secuencia del dominio CH3 con una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), preferiblemente 20 alteraciones o menos, 15 alteraciones o menos, 10 alteraciones o menos, 5 alteraciones o menos, 4 alteraciones o menos, 3 alteraciones o menos, 2 alteraciones o menos, o 1 alteración en comparación con la secuencia del dominio CH3 expuesta en las SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]** u **81 [FS22-053-008]**, preferiblemente la SEQ ID NO: **115 [FS22-172-003]**.

En una realización preferida adicional, la molécula de anticuerpo comprende una secuencia del dominio CH2, con una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), preferiblemente 20 alteraciones o menos, 15 alteraciones o menos, 10 alteraciones o menos, 5 alteraciones o menos, 4 alteraciones o menos, 3 alteraciones o menos, 2 alteraciones o menos, o 1 alteración en comparación con la secuencia del dominio CH2 expuesta en la SEQ ID NO: **76 o 77**.

En realizaciones preferidas en donde uno más aminoácidos están sustituidos con otro aminoácido, las sustituciones pueden ser sustituciones conservativas, por ejemplo, según la siguiente Tabla. 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.

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar - sin carga	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 conservativas. 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.

- 5 Cuando la molécula de anticuerpo comprende una variante de una secuencia de bucle estructural AB, dominio CH3, o secuencia de cadena pesada como se divulga en la presente memoria, la molécula de anticuerpo retiene la secuencia PPY entre las posiciones 15 y 17, del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo. Además, la molécula de anticuerpo retiene una inserción de 5 aminoácidos entre las posiciones 16 y 17 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo. También se divulga en la presente memoria, que la molécula de anticuerpo puede retener la secuencia en las posiciones 97 y 98 del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo.

- 10 Cuando la molécula de anticuerpo comprende una variante de la secuencia del dominio CH3, dominio CH2 y CH3, cadena ligera o cadena pesada divulgada en la presente memoria, la variante no comprende ninguna alteración de aminoácidos en la primera y segunda secuencia localizada en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo. Por ejemplo, la variante puede no comprender ninguna alteración de aminoácidos en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo. Adicionalmente, la variante puede no comprender ninguna alteración de aminoácidos en el bucle estructural CD del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo. Es decir, la variante puede no comprender ninguna alteración de aminoácidos en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3 de la molécula de anticuerpo.

- 15 Cuando la molécula de anticuerpo comprende una variante de una secuencia de cadena ligera o cadena pesada divulgada en la presente memoria, la molécula de anticuerpo no comprende ninguna alteración de aminoácidos en las secuencias de CDR. Por ejemplo, la variante puede no comprender ninguna alteración de aminoácidos en las secuencias de CDR1, CDR2, CDR3, CDR4, CDR5 y/o CDR6.

- 20 La molécula de anticuerpo se une preferiblemente a PD-L1 humano y CD137 humano. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo es capaz de unirse simultáneamente a PD-L1 humano y CD137 humano, en donde CD137 humano y PD-L1 humano se coexpresan. Como se usa en la presente memoria, la coexpresión significa que las dos dianas se expresan en la superficie de una sola célula, o en la superficie de dos células separadas. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede ser capaz de unirse a PD-L1 humano y CD137 humano cuando PD-L1 humano y CD137 humano se coexpresan en una única célula, por ejemplo, una célula inmunitaria, así como puede ser capaz de unirse a PD-L1 humano y CD137 humano cuando PD-L1 humano y CD137 humano se coexpresan en dos células separadas, por ejemplo, una célula inmunitaria que expresa CD137 y una célula tumoral separada que expresa PD-L1 en el microentorno tumoral.

- 25 La molécula de anticuerpo se une preferiblemente a PD-L1 humano con una afinidad (K_D) de 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,4 nM o 0,3 nM o con una afinidad más alta. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se une a PD-L1 humano, con una afinidad (K_D) de 0,3 nM, o con una afinidad más alta.

- 30 El PD-L1 humano puede, por ejemplo, tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **180**. El PD-L1 humano puede ser, por ejemplo, PD-L1 humano recombinante con una etiqueta Avi (hPD-L1-Avi-His), disponible en Acro Biosystems (número de catálogo: PD1-H82E5). El PD-L1 humano recombinante puede biotinilarse.

- 35 La molécula de anticuerpo se une preferiblemente a CD137 dimérico humano con una afinidad (K_D) de 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM o 2 nM, o con una afinidad más alta. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se une a CD137 dimérico humano, con una afinidad (K_D) de 2 nM, o con una afinidad más alta.

- 40 En una realización preferida, la molécula de anticuerpo se une a CD137 dimérico con una afinidad más alta que a CD137 monomérico. En una realización preferida, la molécula de anticuerpo se une a CD137 dimérico con una afinidad que es al menos 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, 110 veces, 120 veces, 130 veces, 140 veces, 150 veces, 160 veces, 170 veces o 200 veces más alta que la afinidad de la molécula de anticuerpo por CD137 monomérico.

- 45 El CD137 humano puede, por ejemplo, tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **186**. Los métodos para producir antígenos CD137 diméricos y monoméricos se describen en los ejemplos.

- 50 La molécula de anticuerpo se une preferiblemente a PD-L1 de cynomolgus y CD137 de cynomolgus. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo es capaz de unirse simultáneamente a PD-L1 de cynomolgus y CD137 de cynomolgus, en donde PD-L1 de cynomolgus y CD137 de cynomolgus se expresan en la superficie de una única célula, o en la superficie de dos células separadas.

- 55 En una realización preferida, la molécula de anticuerpo puede unirse a PD-L1 de cynomolgus con una afinidad (K_D) de 8 nM, 7 nM, 6 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,4 nM o 0,3 nM o con una afinidad más alta. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se une a PD-L1 de cynomolgus, con una afinidad (K_D) de 1 nM, o con una afinidad más alta.

El PD-L1 de cynomolgus puede, por ejemplo, tener la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **184**.

En una realización preferida, la molécula de anticuerpo puede unirse a CD137 dimérico de cynomolgus con una afinidad (K_D) de 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 4 nM, 3 nM o 2 nM o con una afinidad más alta. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se une a CD137 dimérico de cynomolgus, con una afinidad (K_D) de 2 nM, o con una afinidad más alta.

- 5 La molécula de anticuerpo puede unirse a PD-L1 humano y PD-L1 de cynomolgus con una afinidad similar, y/o unirse a CD137 dimérico humano y CD137 de cynomolgus dimérico con afinidad similar. Se cree que esto es beneficioso para garantizar que los estudios de eficacia y toxicidad llevados a cabo con la molécula de anticuerpo en monos cynomolgus sean predictivos de la eficacia y toxicidad de la molécula de anticuerpo en seres humanos.

- 10 Por tanto, en una realización preferida, la molécula de anticuerpo se une a PD-L1 de cynomolgus con una afinidad que no es más de 10 veces, preferiblemente no más de 5 veces menor o mayor que la afinidad con la que la molécula de anticuerpo se une a PD-L1 humano. En una realización preferida, la molécula de anticuerpo se une a CD137 dimérico de cynomolgus con una afinidad que no es más de 10 veces, preferiblemente no más de 5 veces menor o mayor que la afinidad con la que la molécula de anticuerpo se une a CD137 dimérico humano.

- 15 La afinidad de unión de una molécula de anticuerpo a un antígeno cognado, tal como PD-L1 humano, CD137 humano, PD-L1 de cynomolgus o CD137 de cynomolgus puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), tal como Biacore, por ejemplo. En los Ejemplos se describen detalles adicionales de métodos adecuados.

La capacidad de una molécula de anticuerpo para unirse simultáneamente a dos antígenos cognados, por ejemplo, PD-L1 humano y CD137 humano, o PD-L1 de cynomolgus y CD137 de cynomolgus, puede determinarse mediante SPR, tal como Biacore, por ejemplo. En los Ejemplos se describen detalles adicionales de métodos adecuados.

- 20 La molécula de anticuerpo puede ser capaz de bloquear la interacción entre PD-L1 y su receptor, PD-1, preferiblemente PD-L1 humano y PD-1 humano.

- 25 Se sabe que la ruta de señalización de PD-1/PD-L1 es importante en la mediación de la supresión inmunitaria. Por lo tanto, se espera que las moléculas de anticuerpo que son capaces de bloquear esta ruta sean ventajosas porque pueden reducir la supresión inmunitaria y ayudar a aumentar la respuesta antitumoral. La inhibición de la señalización de PD-1/PD-L1 y la activación de CD137 pueden funcionar juntas para aumentar la potencia antitumoral.

La capacidad de una molécula de anticuerpo para bloquear la unión de PD-L1 a PD-1 puede determinarse usando un ensayo bioluminiscente basado en células, por ejemplo, usando un producto de bioensayo de bloqueo de PD-1/PD-L1, por ejemplo, de Promega. La capacidad de una molécula de anticuerpo para bloquear la unión de PD-L1 a PD-1 puede determinarse usando ELISA. En los Ejemplos se describen detalles adicionales de estos ensayos.

- 30 La capacidad de una molécula de anticuerpo para bloquear la unión de PD-L1 a PD-1, también denominada actividad bloqueante de PD-1/PD-L1 en la presente memoria, puede determinarse por referencia a una molécula de anticuerpo que comprende o consiste en la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo **2.14H9OPT** mostrado en WO2011/066389 A1, respectivamente, o la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo **G1/280_02_G02** mostrada en las SEQ ID NO **177** y **178**, respectivamente.

- 35 Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede tener un nivel similar o superior de actividad bloqueante de PD-1/PD-L1 que una molécula de anticuerpo que comprende o consiste en la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo **2.14H9OPT** mostrado en WO2011/066389 A1, o la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo **G1/280_02_G02** mostrado en las SEQ ID NO **177** y **178**, respectivamente.

- 40 La molécula de anticuerpo puede tener una actividad bloqueante de PD-1/PD-L1 que es al menos el 70 %, 80 % o 90 % de la actividad bloqueante de PD-1/PD-L1 de una molécula de anticuerpo que comprende o consiste en la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera del anticuerpo **2.14H9OPT** mostrado en WO2011/066389 A1, o la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo **G1/280_02_G02** mostrado en las SEQ ID NO **177** y **178**, respectivamente.

- 45 La molécula de anticuerpo puede tener una actividad bloqueante de PD-1/PD-L1 que está entre el 70 % y el 130 %, el 80 % y el 120 %, o el 90 % y el 110 % de la actividad bloqueante de PD-1/PD-L1 de una molécula de anticuerpo que comprende o consiste en la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera del anticuerpo **2.14H9OPT** mostrado en WO2011/066389 A1, o la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo **G1/280_02_G02** mostrado en las SEQ ID NO **177** y **178**, respectivamente.

- 50 Como se ha descrito anteriormente, las moléculas de anticuerpo de la invención son capaces de unirse simultáneamente a PD-L1 y CD137, lo que da como resultado la activación (agonismo) de CD137. En una realización preferida, la molécula de anticuerpo es capaz de unirse simultáneamente tanto a PD-L1 humano como a CD137 humano, en donde dicha unión provoca la activación de CD137 humano. En una realización adicionalmente preferida, la molécula de anticuerpo es capaz de unirse simultáneamente tanto a PD-L1 de cynomolgus como a CD137 de cynomolgus, en donde dicha unión provoca la activación de CD137 de cynomolgus. Los métodos ejemplares para ensayar la unión simultánea y la activación incluyen ensayos de activación de células T, como se describe con más detalle a continuación.
- 55

La capacidad de una molécula de anticuerpo para activar las células T puede medirse usando un ensayo de activación de células T. Las células T liberan IL-2 tras la activación. Por lo tanto, un ensayo de activación de células T puede medir la liberación de IL-2 para determinar el nivel de activación de células T inducida por la molécula de anticuerpo.

5 Por ejemplo, la capacidad de la molécula de anticuerpo para activar las células T se determina midiendo la concentración de la molécula de anticuerpo requerida para lograr la liberación mitad de la máxima de IL-2 por las células T en un ensayo de activación de células T. Esto se denomina, más adelante, CE_{50} .

10 En una realización preferida, la molécula de anticuerpo tiene una CE_{50} en un ensayo de activación de células T que está dentro de 50 veces, 40 veces, 30 veces, 20 veces, 10 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces o 2 veces de la CE_{50} de **FS22-172-003-AA/E12v2** en el mismo ensayo, en donde **FS22-172-003-AA/E12v2** consiste en la cadena pesada de la SEQ ID NO: **134** y la cadena ligera de la SEQ ID NO: **17**.

Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede tener una CE_{50} en un ensayo de activación de células T de 30 nM o menos, 25 nM o menos, 20 nM o menos, 14 nM o menos, 10 nM o menos, 5 nM o menos, 4 nM o menos, 3 nM o menos, 2 nM o menos, 1,5 nM o menos, 1 nM o menos, 0,4 nM o menos, 0,4 nM o menos, o 0,3 nM o menos, preferiblemente 1 nM o menos, más preferiblemente 1,5 nM o menos cuando la molécula de anticuerpo se reticula.

15 Además, o alternativamente, la capacidad de una molécula de anticuerpo para activar las células T puede determinarse midiendo la concentración máxima de IL-2 liberada por las células T en un ensayo de activación de células T en presencia de la molécula de anticuerpo ($E_{m\acute{a}x}$).

20 La molécula de anticuerpo puede tener una concentración máxima de IL-2 liberada por las células T en un ensayo de activación de células T en presencia de la molécula de anticuerpo de al menos 1.500 pg/ml, 2.000 pg/ml, 2.500 pg/ml, 3.000 pg/ml o 3.250 pg/ml o más, preferiblemente 2.500 pg/ml o más.

En una realización preferida, la concentración máxima de IL-2 liberada por las células T en un ensayo de activación de células T en presencia de la molécula de anticuerpo está dentro del 20 %, o 10 % de la concentración máxima de IL-2 liberada por las células T en presencia de **FS22-172-003-AA/E12v2** en el mismo ensayo, en donde **FS22-172-003-AA/E12v2** consiste en la cadena pesada de la SEQ ID NO: **134** y la cadena ligera de la SEQ ID NO: **17**.

25 El ensayo de activación de células T comprende preferiblemente células T que expresan CD137 y células que expresan PD-L1, por ejemplo, se pueden preparar células HEK293 que sobreexpresan PD-L1 humano (HEK.hPD-L1) y usar como se describe en los Ejemplos. Alternativamente, o adicionalmente, pueden usarse células que expresan un nivel diferente de PD-L1, tales como las células de la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) y/o células SKBR3. Como se describe en los Ejemplos, HEK.hPD-L1 expresa un alto nivel de PD-L1 humano, las células MDA-MB-231 expresan un nivel medio de PD-L1 humano y las células SKBR3 expresan un nivel bajo de PD-L1.

En una realización preferida, el ensayo de activación de células T no comprende ningún agente capaz de reticular la molécula de anticuerpo distinta de células que expresan CD137 y PD-L1. Los ejemplos de agentes capaces de reticular la molécula de anticuerpo incluyen un anticuerpo anti-CH2 humano, como se describe en los Ejemplos.

35 El ensayo de activación de células T puede ser un ensayo de células T como se describe en la presente memoria, tal como un ensayo de células T generales como se describe en los presentes Ejemplos.

40 Por ejemplo, un ensayo de activación de células T puede ser un ensayo de liberación de IL-2 basado en células T aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas. Por ejemplo, el ensayo de activación de células T puede comprender aislar PBMC humanas de conos de depleción de leucocitos. Los métodos para aislar PBMC se conocen en la técnica y se describen en los presentes ejemplos. Las células T pueden aislarse a continuación de las PBMC. Los métodos para aislar células T (todas las células T) de PBMC se conocen en la técnica y se describen en los presentes Ejemplos.

45 El ensayo de activación puede implicar preparar el número requerido de células T, por ejemplo, en medios experimentales, tales como un medio de células T. El número requerido de células T puede prepararse a una concentración de $1,0 \times 10^6$ células/ml. Las células T pueden estimularse después usando un reactivo de activación de células T adecuado que proporcione las señales requeridas para la activación de las células T. Por ejemplo, el reactivo de activación de células T puede ser un reactivo que comprende CD3 y CD28, tal como perlas que comprenden CD3 y CD28. Las células T aisladas pueden incubarse durante la noche con el reactivo de activación de células T para activar las células T. Después de esto, las células T activadas pueden lavarse para separar las células T del reactivo de activación de células T y resuspenderse en medio de células T a una concentración adecuada, tal como $2,0 \times 10^6$ células/ml. Las células T activadas pueden añadirse después a placas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 humano.

55 Las células (por ejemplo, células HEK.hPD-L1) se pueden sembrar en placas, por ejemplo, a 2×10^5 células por pocillo en placas de cultivo tisular recubiertas con anticuerpo anti-CD3 en medio de cultivo de células T. Después de, por ejemplo, 4 horas de incubación, todo el medio de cultivo de células T puede retirarse y reemplazarse con 100 μ l de medio de cultivo de células T que contiene células T, por ejemplo, a una concentración de $5,0 \times 10^5$ células/ml lo que da como resultado $5,0 \times 10^4$ células/pocillo.

Se puede preparar una dilución adecuada de cada molécula de anticuerpo de ensayo y añadir a los pocillos. Las células T pueden entonces incubarse a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 horas con el anticuerpo de ensayo.

5 Los sobrenadantes pueden recogerse y ensayarse para determinar la concentración de IL-2 en el sobrenadante. Los métodos para determinar la concentración de IL-2 en una solución son conocidos en la técnica y se describen en los presentes ejemplos. La concentración de IL-2 humana puede representarse frente al logaritmo de la concentración de la molécula de anticuerpo. Las curvas resultantes pueden ajustarse usando la ecuación log (agonista) frente a respuesta.

10 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 de enfermedades como se describe en la presente memoria.

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- γ .

15 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.

Alternativamente, la molécula bioactiva puede ser un radioisótopo terapéutico.

20 La radioinmunoterapia se usa en el tratamiento del cáncer, por ejemplo. Los radioisótopos terapéuticos adecuados para radioinmunoterapia son conocidos en la técnica e incluyen itrio-90, yodo-131, bismuto-213, astatina-211, lutecio 177, renio-188, cobre-67, actinio-225, y yodo-125 y terbio-161.

25 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 unión a un resto detectable cognado específico, por ejemplo, avidina marcada.

30 La molécula de anticuerpo puede conjugarse con la molécula bioactiva o marcador detectable por medio de 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.

35 En algunas realizaciones, la molécula bioactiva puede conjugarse con la molécula de anticuerpo mediante un conector escindible. El conector puede permitir la liberación de la molécula bioactiva de la molécula de 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.

40 La invención también proporciona una molécula o moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una molécula de anticuerpo de la invención. El experto en la técnica no tendría dificultad para preparar tales moléculas de ácido nucleico usando métodos bien conocidos en la técnica.

45 La molécula o moléculas de ácido nucleico pueden comprender, por ejemplo, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **82**, **91**, o **116**, que codifican los dominios CH3 de **FS22-053-008**, **FS22-053-017**, y **FS22-172-003**, respectivamente. Preferiblemente, la molécula o moléculas de ácido nucleico comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **116** u **82**, que codifican el dominio CH3 de **FS22-172-003** o **FS22-053-008**, respectivamente. Más preferiblemente, la molécula o moléculas de ácido nucleico comprenden la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: **116**, que codifica el dominio CH3 de **FS22-172-003**.

50 La molécula o moléculas de ácido nucleico pueden codificar el dominio VH y/o el dominio VL, preferiblemente el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo **E12v2**, **E05v2**, o **G12v2**, preferiblemente **E12v2** o **E05v2**, más preferiblemente **E12v2**. Las secuencias del dominio VH y VL de estos anticuerpos se describen en la presente memoria.

Por ejemplo, la(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) comprender:

(i) la secuencia de ácido nucleico del dominio VH del anticuerpo **E12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **13**, y/o la secuencia de ácido nucleico del dominio VL del anticuerpo **E12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **15**; o

(ii) la secuencia de ácido nucleico del dominio VH del anticuerpo **E05v2** expuesta en la SEQ ID NO: **24**, y/o la secuencia de ácido nucleico del dominio VL del anticuerpo **E05v2** expuesta en la SEQ ID NO: **26**; o

(iii) la secuencia de ácido nucleico del dominio VH del anticuerpo **G12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **24**, y/o la secuencia de ácido nucleico del dominio VL del anticuerpo **G12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **31**.

5 La molécula o moléculas de ácido nucleico pueden codificar la cadena pesada y/o la cadena ligera, preferiblemente la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo **FS22-172-003-AA/E12v2**, **FS22-172-003-AA/E05v2**, **FS22-172-003-AA/G12v2**, **FS22-053-008-AA/E12v2**, o **FS22-053-008-AA/E05v2**, preferiblemente del anticuerpo **FS22-172-003-AA/E12v2**. Las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de estos anticuerpos se describen en la presente memoria.

10 Por ejemplo, la(s) molécula(s) de ácido nucleico puede(n) comprender:

(i) la secuencia de ácido nucleico de cadena pesada del anticuerpo **FS22-172-003-AA/E12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **32** o **135**, y/o la secuencia de ácido nucleico de cadena ligera del anticuerpo **FS22-172-003-AA/E12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **39** o **136**; o

15 (ii) la secuencia de ácido nucleico de cadena pesada del anticuerpo **FS22-172-003-AA/E05v2** expuesta en la SEQ ID NO: **138**, y/o la secuencia de ácido nucleico de cadena ligera del anticuerpo **FS22-172-003-AA/E05v2** expuesta en la SEQ ID NO: **139**;

(iii) la secuencia de ácido nucleico de cadena pesada del anticuerpo **FS22-172-003-AA/G12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **141**, y/o la secuencia de ácido nucleico de cadena ligera del anticuerpo **FS22-172-003-AA/G12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **142**;

20 (iv) la secuencia de ácido nucleico de cadena pesada del anticuerpo **FS22-053-008-AA/E12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **144**, y/o la secuencia de ácido nucleico de cadena ligera del anticuerpo **FS22-053-008-AA/E12v2** expuesta en la SEQ ID NO: **145**; o

25 (v) la secuencia de ácido nucleico de cadena pesada del anticuerpo **FS22-053-008-AA/E05v2** expuesta en la SEQ ID NO: **147**, y/o la secuencia de ácido nucleico de cadena ligera del anticuerpo **FS22-053-008-AA/E05v2** expuesta en la SEQ ID NO: **148**.

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.

30 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 que comprende un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. 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.

35 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 fagémidos, según sea apropiado.

40 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 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.

45 Otro aspecto de 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. El método puede comprender además aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo. 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 50 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.

Se sabe que PD-L1 se expresa en muchas células cancerosas y se expresa en células del sistema inmunitario. CD137 se expresa en células del sistema inmunitario, incluyendo células T, en particular, células T CD8⁺, células B, células NK y linfocitos infiltrantes de tumores (TIL). CD137 se expresa a un nivel inferior en células T CD4⁺ que en células T

CD8⁺, pero también se ha mostrado que está implicado en la inducción de la proliferación y activación de algunos subconjuntos de células T CD4⁺.

Se ha mostrado que la activación de CD137 desempeña un papel en la mejora de la proliferación, supervivencia y la función efectora citotóxica de células T CD8⁺, así como en la diferenciación de células T CD8⁺ y el mantenimiento de células T CD8⁺ de memoria. También se ha demostrado que la activación de CD137 potencia la ADCC mediada por células NK, así como la proliferación, supervivencia y producción de citocinas de células B.

Como se describe con detalle en la presente memoria, los presentes inventores han demostrado que las moléculas de anticuerpo de la invención son capaces de unirse simultáneamente a PD-L1 y CD137 con el fin de inducir agonismo de CD137. De esta manera, la molécula de anticuerpo dirige el agonismo de manera autónoma, basándose en la expresión de PD-L1 y CD137, y sin la necesidad de agentes de reticulación adicionales. Dado que PD-L1 se expresa en muchas células cancerosas y CD137 se expresa en células inmunitarias, donde tiene un papel conocido en potenciar la proliferación y supervivencia de las células inmunitarias, se espera que las moléculas de anticuerpo de la invención sean capaces de potenciar una respuesta inmunitaria en localizaciones donde se expresa PD-L1, por ejemplo, en el microentorno tumoral. Además, los presentes inventores han mostrado que el uso de una molécula de anticuerpo que tiene estas propiedades es eficaz en la supresión del crecimiento tumoral en modelos de cáncer de ratón singénico, y que tales moléculas de anticuerpo son más eficaces que la administración de dos moléculas de unión que se unen a PD-L1 y CD137, respectivamente.

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.

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

- (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; y,
- (iv) un método para tratar una enfermedad o trastorno en un individuo, en donde el método comprende administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria.

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

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 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.

También se incluye 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 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 por separado 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 conocida o un agente terapéutico 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 como se describe en la presente memoria. También se proporciona 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 excesiva 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 administración parenteral, por ejemplo, subcutánea o intravenosa, por ejemplo, por 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 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 octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol); polipéptidos 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 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 estéril y mezclarse con solución salina 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 velocidad 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 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) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; y Bagshawe *et al.* (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922). Se pueden usar las dosificaciones específicas indicadas en la presente memoria, o en la 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 localización del área a tratar, y la naturaleza precisa de la molécula de anticuerpo.

Una dosis típica de anticuerpo está en el intervalo 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, de 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 hace referencia 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 TIL que expresan CD137, por ejemplo, en su superficie celular. En una realización, se puede haber determinado que el tumor comprende TIL que expresan CD137. 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 de 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 (por ejemplo, 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 uterino (por ejemplo, cáncer de células escamosas de cuello uterino y adenocarcinoma de cuello uterino), 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 hueso 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 melanoma, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de estómago y tumores estromales gastrointestinales (GIST).

En una realización preferida adicional, el cáncer que se va a tratar usando una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser un cáncer que responde al tratamiento con uno más inhibidores de puntos de control, tal como un anticuerpo que se une a PD-1, PD-L1 o CTLA4. Se cree que tales tumores tienen niveles de TIL más altos y/o carga mutacional tumoral más alta que los tumores que no responden a la terapia con inhibidores de puntos de control. Tales tumores se denominan también tumores templados o calientes.

Los ejemplos de tales tumores incluyen carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), melanoma, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón escamoso, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células no pequeñas [NSCLC] o carcinoma de pulmón de células pequeñas [SCLC]), cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino (tal como carcinoma de células escamosas de cuello uterino o adenocarcinoma endocervical), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer colorrectal (MSI o MSS; por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal), cáncer esofágico, linfoma no de Hodgkin (NHL), cáncer gástrico, cáncer endometrial, cáncer pancreático, cáncer ovárico, carcinoma hepatocelular, mesotelioma, cáncer urotelial, carcinoma de células de Merkel y adenocarcinoma de estómago. En una realización preferida, el cáncer es HNSCC. El cáncer puede ser además un cáncer que no ha sido tratado previamente con un agente quimioterapéutico radioterapéutico, es decir, el individuo a tratar puede ser un paciente con cáncer que no ha recibido tratamiento con un agente quimioterapéutico o radioterapéutico para el cáncer en cuestión.

Alternativamente, el cáncer que se va a tratar usando una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser un cáncer, tal como cáncer pancreático o cáncer de próstata que no responde al tratamiento con uno más inhibidores de puntos de control, tal como un anticuerpo que se une a PD-1, PD-L1 o CTLA4. Un individuo tratado con un anticuerpo de la invención puede ser, por tanto, un paciente con cáncer, tal como un paciente con cáncer pancreático o cáncer de próstata, con una respuesta inadecuada previa a uno más inhibidores de puntos de control, tales como un anticuerpo anti-PD-L1 o anti-PD-1.

Los tumores que no responden al tratamiento con uno más inhibidores de puntos de control también se denominan tumores fríos. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que el tratamiento de un cáncer, que no responde al tratamiento con uno más inhibidores de puntos de control solos, con quimioterapia, radioterapia, un agente inmunoterapéutico, tal como un agente inmunoestimulador, o una vacuna antitumoral dará como resultado la muerte de las células cancerosas que a su vez dará como resultado un aumento en los TIL en el tumor y una mayor expresión de receptores inmunosupresores, que a su vez hará que el cáncer responda al tratamiento con inhibidores de puntos de control, es decir, convertirá un tumor frío en un tumor caliente. Por tanto, la molécula de anticuerpo de la invención puede ser para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un individuo, en donde el cáncer no responde, o es refractario, al tratamiento con uno más inhibidores de puntos de control solos, y en donde el método comprende administrar la molécula de anticuerpo al individuo en combinación con un agente quimioterapéutico, radioterapéutico inmunostimulador, o una vacuna anticancerosa. También se contempla un método para tratar un cáncer en un individuo, en donde el cáncer no responde, o es refractario, al tratamiento con uno más inhibidores de puntos de control solos, y en donde el método comprende administrar la molécula de anticuerpo al individuo en combinación con un agente quimioterapéutico, radioterapéutico o inmunoestimulador, o una vacuna anticancerosa.

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 de piel 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 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 para 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 otra terapia o agente terapéutico anticanceroso, tal como una terapia o agente terapéutico anticanceroso que se ha mostrado que es adecuado, o potencialmente 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 radionúclido, 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 quimérico (CAR), TIL autólogas 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 o radioterapia, por ejemplo, desencadenará una respuesta inmunitaria mayor contra el cáncer que la que se logra con quimioterapia o radioterapia sola.

Uno más agentes quimioterapéuticos para administración en combinación con una molécula de anticuerpo como se describe en la presente 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, cobemitinib y trametinib; los inhibidores de PARP incluyen piraparib; los inhibidores de la enzima B-Raf incluyen vemurafenib y dabrafenib; los agentes alquilantes incluyen dacarbazina, ciclofosfamida y temozolomida; los análogos de platino incluyen carboplatino, cisplatino y oxaliplatino; los análogos de nucleósidos incluyen azacitidina, capecitabina, fludarabina, fluorouracilo y gemcitabina y; los antifolatos incluyen metotrexato y pemetrexed. Otros agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en la presente invención incluyen defactinib, entinostat, eribulina, 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 la administración en combinación con una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser radioterapia de haz externo o braquiterapia.

Los radionúclidos para la administración con una molécula de anticuerpo como se describe en la presente se pueden seleccionar del grupo que consiste en: itrio-90, yodo-131, bismuto-213, astatina-211, lutecio 177, renio-188, cobre-67, actinio-225, yodo-125 y terbio-161.

Un agente inmunoterapéutico para la administración en combinación con una molécula de anticuerpo como se describe en la presente memoria puede ser una molécula de anticuerpo terapéutico, nucleótido, citocina o terapia basada en citocinas. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo terapéutico puede unirse a una molécula reguladora inmunitaria, por ejemplo, una molécula de punto de control inhibidora o una molécula coestimuladora inmunitaria, un receptor del sistema inmunitario innato, o un antígeno tumoral, por ejemplo, un antígeno tumoral de la superficie celular o un antígeno tumoral soluble. Los ejemplos de moléculas reguladoras del sistema inmune a las que puede unirse la molécula de anticuerpo terapéutico incluyen CTLA-4, LAG-3, TIGIT, TIM-3, VISTA, PD-L1, PD-1, CD47, CD73, CSF-1R, KIR, CD40, HVEM, IL-10 y CSF-1. Los ejemplos de receptores del sistema inmunitario innato a los que puede unirse la molécula de anticuerpo terapéutico incluyen TLR4, TLR7, TLR9, receptores de tipo 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, EGFV, CD20 y TGF-beta.

El nucleótido para la 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, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-9, IL-15, IL-18, IL-21 conjugada 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. 2000 Development of Cancer Vaccines). 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, con y 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.

Las características divulgadas en la descripción anterior, o en las siguientes reivindicaciones, o en los dibujos adjuntos, expresadas en sus formas específicas o en términos de un medio para realizar la función divulgada, o un método o proceso para obtener los resultados divulgados, según sea apropiado, pueden, por separado, o en cualquier combinación de tales características, utilizarse para realizar la invención en las diversas formas de la misma.

Aunque la invención se ha descrito junto con las realizaciones ejemplares descritas anteriormente, muchas modificaciones y variaciones equivalentes serán evidentes para los expertos en la técnica cuando se les proporcione esta divulgación. Por consiguiente, las realizaciones ejemplares de la invención expuestas anteriormente se consideran ilustrativas y no limitativas.

Para evitar cualquier duda, cualquier explicación teórica proporcionada en la presente memoria se proporciona con el fin de mejorar la comprensión de un lector. Los inventores no desean estar limitados por ninguna de estas explicaciones teóricas.

Cualquier encabezamiento de sección usado en la presente memoria es solo para fines organizativos y no debe interpretarse como limitante de la materia objeto descrita.

A lo largo de esta memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprenden" e "incluyen", y variaciones tales como "comprende", "que comprende" y "que incluye" se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía de esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

Debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Los intervalos pueden expresarse en la presente memoria como de "aproximadamente" un valor particular y/o a "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico es opcional y significa, por ejemplo, +/- 10 %.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección y caracterización de antígenos

Los métodos de selección y cribado usados para identificar mAb² que son capaces de unirse a PD-L1 y CD137 y de agonizar CD137 requerían el uso de diversos antígenos de PD-L1 y CD137. La producción de estos antígenos se describe con más detalle a continuación.

1.1 Antígenos CD137 recombinantes

Los miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF), tales como CD137, se conocen por su tendencia a formar multímeros que se agrupan entre sí cuando se unen a sus ligandos cognados (Croft, M. 2003). Esta propensión a agregarse por su funcionalidad hace difícil producir proteínas recombinantes solubles que no se agregan en solución para su uso en selecciones *in vitro* tales como presentación en fagos y levaduras y para la caracterización de proteínas seleccionadas.

Se ensayaron varios antígenos recombinantes disponibles comercialmente y se encontró que la mayoría era inadecuada para su uso en estas selecciones debido a los niveles de agregados presentes. De los ensayos, solamente la proteína de fusión hFc-CD137 secretada humana, biotinilada (BPS Biosciences, no. de catálogo 71171), designada "hCD137-hFc-Avi-BPS" en lo sucesivo en la presente memoria, tenía una agregación lo suficientemente baja como para ser adecuada y se usó en selecciones, aunque con éxito limitado (véase el **Ejemplo 2**).

Como la mayoría de los antígenos disponibles comercialmente se consideraron inadecuados, se produjeron internamente los siguientes antígenos CD137 diméricos y monoméricos recombinantes (véase la **Tabla 1**), para su uso en las selecciones:

Tabla 1: Antígenos CD137

Tipo	Designación	Especie	Soluble o celular	Biotinilado	Formato de antígeno
Recombinante	mCD137-mFc-Avi	Ratón	Soluble	Sí	Dímero
Recombinante	mCD137-Avi-His	Ratón	Soluble	Sí	Monómero
Recombinante	hCD137-mFc-Avi	Humano	Soluble	Sí	Dímero
Recombinante	hCD137-Avi-His	Humano	Soluble	Sí	Monómero
Recombinante	cCD137-mFc-Avi	Cyno	Soluble	Sí	Dímero

Se produjeron antígenos monoméricos clonando ADN que codificaba el dominio extracelular de CD137 humano (SEQ ID NO: 186) o de ratón (SEQ ID NO: 188) junto con una secuencia Avi y seis residuos histidina C-terminales en vectores pFUSE modificados (Invitrogen no. de cat pfuse-mg2afc2) usando enzimas de restricción EcoRI-HF y BamHI-HF. Los vectores se transfectoron en células HEK293-6E (National Research Council of Canada), y el CD137 expresado se purificó usando una columna de níquel HisTrap™ excel (GE LifeSciences 29048586) y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para asegurar que el antígeno era una especie única y no contenía agregados.

Para producir los antígenos diméricos, se clonaron construcciones de ADN que codificaban el dominio extracelular de CD137 humano, de ratón o de cynomolgus fusionado con el dominio Fc de mlgG2a junto con una secuencia Avi en vectores pFUSE modificados y se transfectoron en células HEK293-6E. Se purificó CD137 recombinante usando una columna de proteína A MabSelect SuRe™ (GE Healthcare, 11003494) y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para garantizar que el antígeno era una especie única y no contenía agregados.

Cada uno de los antígenos diméricos y monoméricos se biotinilaron usando un kit de reacción de biotina-proteína ligasa de biotina BirA (Avidity LLC, BirA500) para producir antígenos CD137 monoméricos marcados con una única molécula de biotina y antígenos CD137 diméricos marcados con dos moléculas de biotina, una por cada uno de los dos monómeros. Se mezclaron 3 mg de antígeno con 7,8 µl de mezcla de enzimas BirA hasta una relación molar de enzima a sustrato de 1:50. A continuación, se añadieron aditivos según las recomendaciones del fabricante (142 µl de Biomix A, 142 µl de Biomix B, 142 µl de biotina) y la mezcla de reacción se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. Para mantener la integridad de la proteína biotinilada, el tampón de la mezcla de reacción se intercambió inmediatamente a DPBS (Life Technologies 14190-169) usando filtros Amicon de 30 µm (Merck Millipore UFC503096).

Las proteínas se purificaron adicionalmente mediante SEC para asegurar la eliminación de la enzima BirA y la producción de una preparación final de proteína monodispersa de alta calidad sin agregados de alto peso molecular. Con más detalle, los materiales del mismo lote de producción se mezclaron entre sí y se analizaron para determinar la estabilidad y la pureza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC), electroforesis en gel de poliácridamida SDS (SDS-PAGE) y cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo (SEC-MALS). La biotinilación completa de las proteínas se confirmó en un gel de SDS-PAGE con desplazamiento de estreptavidina. Se confirmó que los antígenos recombinantes humanos y de ratón se unían a anticuerpos de control positivo anti-CD137 (20H4.9 (Patente de EE. UU. No. 7288638)) y Lob12.3 (Universidad de Southampton), respectivamente) *in vitro* mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) y a células DO11.10 que

expresaban ligando de CD137 humano y de ratón mediante citometría de flujo. Las células se incubaron con los antígenos CD137 durante 1 hora, y después se usó un anticuerpo anti-fragmento Fc de ratón marcado fluorescentemente para detectar la unión celular. Se confirmó que el antígeno de cyno recombinante se unía a las células DO11.10 (National Jewish Health) que expresaban ligando de CD137 de cyno mediante citometría de flujo como se describió anteriormente. Para asegurar una pureza tan alta como fuera posible para los materiales usados en los protocolos de selección, se realizó una caracterización de proteínas exhaustiva de los antígenos para asegurar que la presencia de agregados de proteínas no excediera del 2 %.

1.2 Antígenos CD137 expresados en células

Se produjeron células DO11.10 (National Jewish Health) que expresaban CD137 de ratón de longitud completa (SEQ ID NO: 187) o CD137 humano (SEQ ID NO: 185), designadas 'DO11.10.mCD137' y 'DO11.10.hCD137' respectivamente, con el fin de presentar el antígeno en una conformación unida a membrana, más similar a su forma natural, para selecciones y caracterización adicional de Fcab seleccionados, como se enumera en la **Tabla 2**.

Se usó transducción lentiviral para generar estas células DO11.10 que sobreexpresaban receptores CD137 humanos o de ratón usando el Sistema de Empaquetamiento Lenti-X HTX (Clontech, no. de catálogo 631249). El vector de expresión Lenti-X (pLVX) (Clontech, no. de catálogo 631253) que contenía ADNc que codificaba el CD137 humano (SEQ ID NO: 185) o que codificaba el CD137 de ratón (SEQ ID NO: 187) se cotransfectó con una Mezcla de Empaquetamiento Lenti-X HTX en la línea celular Lenti-X 293T (Clontech, no. de catálogo 632180) para generar virus. La línea celular DO11.10 se transdujo después con estos vectores lentivirales.

La expresión de CD137 humano o CD137 de ratón en estas células se confirmó mediante la unión de anticuerpos de control positivo anti-CD137 20H4.9 y Lob12.3, respectivamente, a las células mediante citometría de flujo. Las células se incubaron con los anticuerpos de control positivo humanos o de ratón durante 1 hora y después se usó un anticuerpo de detección anti-Fc humano marcado fluorescentemente (Strattech Scientific Ltd, no. de catálogo 109-546-098-JIR) para detectar la unión celular.

También se generaron células DO11.10 que expresaban CD137 de cynomolgus (SEQ ID NO: 189), designadas 'DO11.10.cCD137' usando la misma metodología de transducción lentiviral y se usaron para ensayar la reactividad cruzada de Fcab anti-CD137 humano con CD137 de cynomolgus. La expresión de CD137 de cynomolgus se confirmó mediante la unión de un anticuerpo de control positivo anti-CD137 (MOR7480.1, US 2012/0237498 A1) a las células mediante citometría de flujo como se describió anteriormente.

Tabla 2: CD137 expresado en células

Tipo	Designación	Especie	Presentación
Célula	DO11.10.hCD137	Humano	Expresado en células
Célula	DO11.10.mCD137	Ratón	Expresado en células
Célula	DO11.10.cCD137	Cyno	Expresado en células

1.3 PD-L1 de ratón y humano 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 His C-terminal, así como con una etiqueta de CD4⁺ monomérica de rata, dominios 3 y 4 (rCD4) (Brown y Barclay, 1994), un dominio Fc de IgG1 humana dimérico o, para PD-L1 humano solamente, una etiqueta Avi (que dan como resultado hPD-L1-rCD4-His (SEQ ID NO: 195), hPD-L1-Fc-His (SEQ ID NO: 196), mPD-L1-rCD4-His (SEQ ID NO: 197), mPD-L1-Fc-His (SEQ ID NO: 198) y hPD-L1-His-Avi (SEQ ID NO: 199). La producción de antígenos en diferentes formatos permitió la eliminación de los ligantes de etiquetas durante rondas secuenciales de cribado y selección por presentación en fagos de anticuerpos. Los plásmidos de expresión que codificaban los antígenos se transfectaron 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 mediante cromatografía de afinidad en Ni-NTA-sefarosa (Schofield *et al.*, 2007). Los antígenos de PD-L1 que contenían rCD4 y Fc se biotinilaron usando reactivo de 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 fagos 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).

Ejemplo 2: Selección y caracterización de Fcab anti-CD137 humano

2.1 Selección sin activación de Fcab anti-CD 137 humano

Con el fin de seleccionar Fcab que se unen a CD137 humano, se emplearon campañas de selección de presentación en levaduras y fagos, para maximizar la diversidad de los Fcab identificados. Ambas superficies celulares, presentaron CD137 humano y CD137 dimérico humano recombinante y se usaron para proporcionar una variedad de formatos de antígeno, con el fin de ejercer presión de selección dirigida por avidez contra proteínas CD137 diméricas o multiméricas. La obtención de un Fcab que se uniera ávidamente a complejos de CD137 en lugar de con alta afinidad por CD137 monomérico se consideró beneficiosa porque dicho Fcab se dirigiría preferiblemente a células T activadas y cebadas solo, donde la regulación al alza de CD137 se produce después de la estimulación de las células T. Sin desear estar ligados por la teoría, se propuso la hipótesis de que sería más probable que las células T con niveles muy bajos o despreciables de expresión en la membrana de CD137 tuvieran CD137 en estado monomérico, a diferencia de las células T activadas con CD137 altamente regulado al alza donde la mayoría de la proteína estaría en estados diméricos, triméricos o multiméricos superiores. Como resultado de las selecciones dirigidas por avidez, el Fcab se unirá preferiblemente a células T activadas y no se unirá bien a células T sin activar que presentan solo CD137 monomérico. Seleccionando un Fcab de CD137 ávido, se reduciría la activación potencial de células T fuera de diana, con toxicidad reducida asociada.

Se usaron seis bibliotecas de fagos sin activar que presentaban el dominio CH3 de IgG1 humana para selecciones mediante presentación de fagos. Las seis bibliotecas comprendían bucles AB aleatorizados (que comprendían residuos en las posiciones 14-18 según la numeración IMGT) y bucles EF aleatorizados (que comprendían residuos en las posiciones 92-101 según la numeración IMGT). Una de las bibliotecas comprendía clones con una inserción de dos o cuatro aminoácidos (codificados por dos o cuatro codones NNK) en la posición 101 en el bucle EF (los residuos insertados están en las posiciones 101.4 - 101.1 según la numeración IMGT).

Se cribaron 3.230 clones de fagos mediante ELISA de fagos para determinar la unión al antígeno hCD137 recombinante dimérico y se usó Fc recombinante como control negativo. Se cribaron 1.140 clones de fagos mediante FACS de fago para determinar la unión específica a células DO11.10.hCD137. A continuación, se secuenciaron los éxitos individuales y se asignó a las 76 secuencias únicas resultantes un identificador de clon Fcab y se subclonaron en un vector de expresión pTT5 (National Research Council of Canada) que contenía un casete de expresión de cadena pesada de IgG1 HeID1.3 con el fin de expresar los clones de Fcab en formato mAb² (véase el **Ejemplo 3.2**).

Se usaron cuatro bibliotecas de levadura sin activar que presentaban los dominios CH1 a CH3 de IgG1 humana para la selección mediante presentación en levadura. Las cuatro bibliotecas comprendían bucles AB aleatorizados (que comprendían residuos en las posiciones 14 a 18 según la numeración de IMGT) y bucles EF aleatorizados (que comprendían residuos en las posiciones 92 a 101 según la numeración de IMGT) en el dominio CH3. Dos de las bibliotecas comprendían además una inserción de cinco residuos de aminoácidos en la posición 16 en el bucle AB del dominio CH3 (residuos en las posiciones 16.5 a 16.1 según la numeración de IMGT).

Se cribaron 2.784 clones individuales de levadura identificados a partir de selecciones de biblioteca para determinar la unión a antígeno usando un ensayo de unión a antígeno de citometría de flujo que implicaba incubar las células con antígeno humano dimérico recombinante biotinilado o fragmento Fc de ratón para discriminar contra clones de levadura que se unían a la porción Fc del antígeno hCD137 recombinante. Las selecciones se repitieron con concentraciones y condiciones de antígeno variables, tales como aumentar la temperatura de inducción, disminuir la astringencia de la selección o reducir el número de rondas con el fin de aumentar el número de aciertos. La secuenciación de aciertos reveló una diversidad de salida considerablemente baja, con sólo 9 clones de Fcab que tenían secuencias únicas identificadas: FS22-053, FS22-172, FS22-173, FS22-174, FS22-175, FS22-176, FS22-177, FS22-178 y FS22-179.

2.2 Preparación de Fcab anti-CD137 humano en formato mAb² "simulado"

Se produjeron anticuerpos mAb² "simulados" que consistían en moléculas de IgG1 que comprendían los 76 clones de Fcab anti-CD137 humano aislados de fagos y 9 clones aislados de selecciones de levaduras para permitir la caracterización de los Fcab en un formato mAb². El mAb² simulado se prepararon sustituyendo parte de los Fcab del dominio CH3 que comprendían los bucles AB, CD y EF, por la región correspondiente del dominio CH3 del anticuerpo HeID1.3 anti lisozima de huevo de gallina. La generación del anticuerpo HeID1.3 se describe en Tello *et al.*, 1993. Las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo HeID1.3 se muestran en las SEQ ID NO: **191** y **159**, respectivamente. Las moléculas de mAb² simulado se produjeron mediante expresión transitoria en células HEK293-6E. Para evaluar la cantidad de proteína producida, se cuantificó el contenido de proteína IgG mediante interferometría de biocapa usando la plataforma Octet QKe con biosensores de cuantificación de Proteína A de PALL (18-5021). Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A usando columnas mAb SelectSure. 53 proteínas mAb² de CD137 derivadas de fagos presentaron mediciones por debajo del umbral de detección y, por lo tanto, se determinó que eran inadecuadas para análisis adicionales. Se purificaron 32 mAb² usando columnas de proteína A mAb Select SuRe (GE Healthcare, 11003494).

Una selección de estos mAb² se ensayó entonces para determinar la unión al antígeno recombinante humano (hCD137-mFc-Avi biotinilado) usando interferometría de biocapa (BLI) usando la plataforma Octet QKe. 12 mAb² no se unieron y 19 se unieron a sensores recubiertos con CD137 (FS22-007, FS22-033, FS22-042, FS22-049, FS22-050, FS22-052, FS22-053, FS22-054, FS22-169, FS22-172, FS22-173, FS22-174, FS22-179, FS22-180, FS22-181, FS22-183, FS22-187, FS22-194, FS22-195).

2.3 Actividad de mAb² simulados anti-CD 137 seleccionados en un ensayo indicador de NF-κB humano

La multimerización y agrupamiento se requieren para la señalización de TNFR (Bitra *et al.*, 2017). El CD137 agrupa y activa la ruta de señalización de NF-κB cuando interacciona con su ligando cognado, CD137L. Las moléculas agonistas imitan al ligando en la conducción del agrupamiento y activación de CD137, activando de este modo la ruta de señalización de NF-κB. Se sabe que algunos anticuerpos agonistas pueden provocar inherentemente el agrupamiento de CD137 tras la unión, por ejemplo, urelumab, mientras que otros requieren la reticulación adicional del propio anticuerpo para inducir el agrupamiento de CD137, tal como utomilumab (Fisher *et al.*, 2012). Se sabe que los receptores Fc gamma en células efectoras inducen dicha reticulación *in vivo*, aunque esto es ineficiente y puede producirse lejos del sitio de interés terapéutico. Dado que las toxicidades limitantes de la dosis se han asociado con urelumab, pero no con utolimubab, se decidió seleccionar Fcab de unión anti-CD137 que no tenían la capacidad de agonizar inherentemente, sino seleccionar solo aquellos que requerían reticulación adicional para inducir el agrupamiento de CD137. Por lo tanto, se desarrolló un ensayo que puede detectar la activación de la ruta de señalización de NF-κB en una célula tras la agrupación de CD137 expresado en la superficie celular por anticuerpos reticulados, pero que mostró poca actividad cuando los anticuerpos no estaban reticulados. Este ensayo se usó después para ensayar la actividad funcional agonista de 27 clones de Fcab anti-CD137 en formato de mAb² simulado y 6 clones de Fcab anti-CD137 en formato de mAb² anti-CD20, independientemente de si se encontró que los Fcab se unían a antígeno recombinante por BLI o no.

Esto puede medirse mediante la activación de la ruta de señalización de NF-κB en el ensayo. Se usó proteína L como agente de reticulación para dirigir la reticulación del mAb² simulado a través de las porciones Fab en el ensayo y se midió la activación de NF-κB.

El ADNc que codificaba CD137 humano (SEQ ID NO: 185) se subclonó en el vector pMSCV-neomicina (Takara Clontech, Cat. 634401) usando enzimas de restricción EcoRI-HF y XhoI. Se usó la línea celular RetroPack PT67 (Clontech, Cat. 631510) para producir partículas retrovirales siguiendo el protocolo del fabricante. Este retrovirus se usó posteriormente para transducir células HEK.FRT.luc que se generaron previamente transduciendo una línea celular Flp-In T-REx 293 HEK (Life Technologies, R780-07) con lentivirus de Indicador de NFκB Qiagen Cignal Lenti (luc) (Qiagen, no de catálogo 336851) que contenía un promotor sensible a NF-κB que controlaba la expresión de la luciferasa. Estas células HEK.FRT.luc.hCD137 se usaron para cribar el mAb² simulado que contenía los ligantes de CD137 identificados en las selecciones.

Una dilución 2 μM de cada mAb² simulado se preparó en DPBS (Life Technologies, 14190169) y se diluyó adicionalmente 1:3 en medio de células indicadoras (DMEM (Gibco, Cat. 61965-026); FCS al 10% (Gibco, Cat. 10270-106); 1x PenEstrep (Gibco, Cat. 15140-122); Blasticidina 15 μg/ml (Melford Laboratories Ltd. Cat. B1105); Puomicina 5 μg/ml (Life technologies, Cat. A11113803); Zeocina 100 μg/ml (InvivoGen, Cat. 11006-33-0); Geneticina 500 μg/ml (Life Technologies, Cat. 10131-027). Se usó proteína L (Life Technologies, 21189), como agente de reticulación artificial y se mezcló con las moléculas de mAb² en una relación molar 1:4. Después de una incubación de 24 horas, las células se trataron con 100 μl de reactivo de ensayo de luciferasa Bio-Glo™ de Promega (Promega no. de cat. G7941) según las instrucciones del fabricante y la luminiscencia se midió con un tiempo de integración de 0,5 segundos en un lector de placas con el software Gen5, BioTek. Los valores de luminiscencia son una medida de la luciferasa producida en respuesta a la activación de la ruta de señalización de NF-κB por el agrupamiento de CD137 inducido por Fcab reticulados. Los valores de luminiscencia se representaron gráficamente frente al logaritmo de la concentración de Fcab y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación de logaritmo (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism.

Los aciertos se identificaron por tener al menos un aumento de 10 veces en la señal de luciferasa cuando se reticuló con proteína L en comparación con cuando no se reticuló. Se determinó que estos clones eran capaces de inducir la agrupación de CD137 y la activación posterior de las rutas de señalización aguas abajo. De todos los clones ensayados, dos fueron capaces de inducir este aumento de 10 veces en la luciferasa tras la reticulación, FS22-053 y FS22-172, aunque no se pudo determinar una CE₅₀ para ninguno de ellos. Ambos se seleccionaron para una caracterización adicional en un ensayo de activación de células T DO11.10. Sorprendentemente, no se observó actividad para los clones restantes en condiciones de reticulación a pesar de la unión a la diana de CD137 por BLI, quizás indicando que se unían a un epítipo irrelevante en CD137, o que la afinidad de tales clones no era suficiente para unirse a CD137 lo suficientemente fuerte como para iniciar la cascada de señalización de NF-κB. En general, aunque se ensayaron más de 30 Fcab, solo se identificaron dos Fcab (FS22-053 y FS22-172) a partir de las selecciones sin activar que exhibieron la función deseada en el ensayo indicador de NF-κB cuando se reticularon y tuvieron poca actividad cuando no se reticularon.

2.4 Actividad del mAb² simulado anti-CD 137 seleccionado en un ensayo de activación de células T DO11.10

La agrupación de CD137 a través de moléculas agonistas en células T activadas incita la activación de células T y la señalización aguas abajo que da como resultado, pero no se limita a, la producción de IL-2. Puesto que FS22-053 y FS22-172 se identificaron como que tenían actividad en el ensayo de indicador de NF-κB, se ensayó su capacidad para activar CD137 en un ensayo de activación de células T. Se desarrolló un ensayo de activación de células T DO11.10 usando células T DO11.10 modificadas por ingeniería para sobreexpresar CD137 humano y se evaluó la activación de células T midiendo la liberación de IL-2.

Se transdujeron células T DO11.10 (National Jewish Health) con un vector lentiviral diseñado para sobreexpresar CD137 de ratón o humano como se ha descrito anteriormente. Además de FS22-053 y FS22-172, se ensayaron los siguientes clones en este ensayo de activación de células T DO11.10: FS22-007, FS22-033, FS22-042, FS22-049, FS22-050, FS22-052, FS22-054, (todos en formato de mAb² "simulado" HeID1.3). Se prepararon diluciones de mAb² o mAb de control positivo 20H4.9 con o sin reticulador de Proteína L recombinante (Life Technologies, 21189) y se añadieron a células DO11.10.hCD137 en una placa de fondo redondo de 96 pocillos que se había recubierto durante la noche con 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (clon 17A2, Biolegend, 100208). Después de una incubación de 18 horas, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo con el kit de ELISA para IL-2 de ratón (eBioscience, 88-7024-86) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de placas con el software Gens, 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 (Gens Software, BioTek). La concentración de mL-2 se representó frente al logaritmo de la concentración de mAb² o mAb de referencia y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación log (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism.

Los clones FS22-053 y FS22-172 mostraron una actividad significativamente mejorada cuando se reticularon con Proteína L en este ensayo. FS22-053 tenía una actividad de 126 nM cuando no estaba reticulado y una actividad de 21 nM cuando estaba reticulado (una mejora de 6 veces), mientras que FS22-172 tenía una actividad de 950 nM cuando no estaba reticulado y una actividad de 44 nM cuando estaba reticulado (una mejora de 22 veces). Como resultado, se seleccionaron ambos clones para maduración de afinidad.

El **Ejemplo 2.4** muestra que FS22-053 y FS22-172 podrían dirigir el agrupamiento y activación de CD137 en la superficie de las células T DO11.10 cuando se reticulan por Proteína L en los formatos de mAb² ensayados.

Ejemplo 3: Maduración de afinidad de Fcab anti-CD137 humano y posterior caracterización

Como se ha analizado previamente, se seleccionaron dos clones para maduración de afinidad basándose en sus características funcionales en el ensayo indicador de NF-κB, ensayos de activación de células T DO11.10, FS22-053 y FS22-172).

3.1 Maduración de afinidad de FS22-053 y FS22-172

Se construyeron cuatro bibliotecas presentadas en levadura a partir de los clones Fcab FS22-053 y FS22-172. Siete residuos (en las posiciones 15-16.1 según IMGT) se aleatorizaron usando cebadores ELLA en el bucle AB del dominio CH3 de cada clon para preparar las bibliotecas FS22-053 AB y FS22-172 AB. Cinco residuos (en las posiciones 92-94 y 97-98 según IMGT) se aleatorizaron usando cebadores ELLA en el bucle EF del dominio CH3 dando como resultado las bibliotecas FS22-053 EF y FS22-172 EF.

Para las bibliotecas FS22-053 AB y FS22-053 EF, y FS22-172 AB y FS22-172 EF, se realizaron tres o cuatro rondas de selección en las bibliotecas de levadura para seleccionar clones madurados por afinidad usando antígeno hCD137-mFc-Avi dimérico o antígeno hCD137-Avi-His monomérico. Se usó antígeno monomérico en alternancia con antígenos diméricos para asegurar que los clones conservaban la afinidad por el antígeno y no se unían exclusivamente a través de la avidéz. El uso de antígeno monomérico o dimérico, así como la concentración usada, se determinó empíricamente durante cada ronda por citometría de flujo, determinada por si se observó enriquecimiento contra el antígeno monomérico o dimérico en la ronda anterior. Siempre que fue posible, se usó una puerta de clasificación por encima del parental para aislar clones madurados por afinidad en comparación con la molécula parental. La presión de selección se aumentó hasta 1 nM de antígeno dimérico. Durante cada ronda de selección, se colocaron clones individuales en placas de agar para evaluar el progreso de la selección. Cada clon se cultivó e indujo individualmente y a continuación se determinaron sus parámetros de unión y estructurales mediante citometría de flujo usando antígeno dimérico biotinilado, así como marcadores estructurales anti-CH2 como se describió anteriormente. Esta cascada de cribado se siguió para permitir la determinación del éxito de la selección basándose en una muestra de clones de la salida de selección y para permitir el cribado temprano de clones individuales que podrían producirse posteriormente como proteínas solubles.

Se cribaron 1.152 clones individuales de levadura en total para determinar la unión a antígeno recombinante biotinilado en una citometría de flujo de unión a antígeno como se describió anteriormente. Las selecciones en la biblioteca FS22-053 EF dieron como resultado el enriquecimiento de 138 secuencias de bucle únicas. Asimismo, se aislaron 30 secuencias de bucle únicas de la biblioteca FS22-172 AB. Las bibliotecas FS22-053 AB y FS22-172 EF no contenían ningún clon que mostrara ninguna mejora de la unión sobre los clones parentales. El análisis de secuencia a través

de los clones de mejor unión de las bibliotecas de AB FS22-053 EF y FS22-172 reveló un patrón de secuencia PPY conservado en los bucles de AB.

La presencia de un resto PPY conservado puede promover la formación de una región de unión extendida mediante la introducción de un bucle más rígido o expuesto basándose en la flexibilidad limitada de los residuos de prolina. Alternativamente, la secuencia PPY puede representar un resto conservado específico implicado en la unión para estos clones ya que se ha demostrado que las secuencias ricas en prolina se unen a secuencias aromáticas en proteínas del dominio SH3. Además, dado que la secuencia conservada PPY se ha seleccionado independientemente en dos linajes separados de Fcab, puede ser importante para la unión de epítomos en CD137. Adicionalmente, se requiere un patrón de secuencia LE o LD conservado en los bucles EF del dominio CH3 de los clones de los linajes tanto FS22-053 como FS22-172, lo que sugiere que este resto de aminoácidos en el bucle EF se requiere para una unión mejorada.

Con el fin de evaluar el progreso de las selecciones y si sería necesario recombinar bucles AB y EF mutados entre clones madurados por afinidad, los cinco clones únicos superiores de la biblioteca FS22-053 EF (FS22-053-008, FS22-053-009, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012) se clasificaron presentando unión específica a antígeno humano dimérico 10 nM (más del 30 % de células positivas para APC en un ensayo de unión de citometría de flujo), y los seis clones únicos superiores de la biblioteca FS22-172 AB (FS22-172-001, FS22-172-002, FS22-172-003, FS22-172-004, FS22-172-005, FS22-172-006, mostrando todos por encima del 10 % de células positivas para APC cuando se cribaron con antígeno humano dimérico 10 nM en el mismo ensayo) se produjeron como mAb² simulado (HeiD1.3) y mAb² de modelo (PD-L1) para evaluar la mejora funcional y cinética de los bucles aleatorizados.

3.2 Construcción de Fcab anti-CD 137 humano en formato de mAb² "simulado" y "modelo"

Se prepararon 16 clones madurados por afinidad derivados del clon FS22-053 parental (FS22-053-001 a FS22-053-016), y 6 clones madurados por afinidad derivados de los clones FS22-172 parentales (FS22-172-001 a FS22-172-006) en formato mAb² "simulado" y "modelo". Los clones FS22-053-001 a FS22-053-007 no se continuaron adicionalmente ya que no se expresaron en formato mAb² a un nivel que permitiera la purificación aguas abajo para ensayos y caracterización adicional.

Se prepararon anticuerpos mAb² "simulados" que comprendían los Fcab anti-CD137 humano en HeiD1.3 para la caracterización adicional de los Fcab madurados por afinidad en formato de mAb². Estos mAb² se prepararon como se describe en el **Ejemplo 2.2**.

También se produjeron mAb² "modelo" que comprendían los Fcab anti-CD137 humano y también una región Fab de unión a PD-L1 (clon YW243.55.S70 de US 8.217.149 B2). Estos se prepararon de una manera similar al método descrito en el **Ejemplo 2.2** mediante sustitución de parte del CH3 del anticuerpo de unión anti-PD-L1 que contiene los bucles AB, CD y EF con la región correspondiente del Fcab. Estos mAb² modelo de PD-L1 comprendían una mutación LALA en el dominio CH2 (AA). Se sabe que la introducción de la mutación LALA en el dominio CH2 de la IgG1 humana reduce la unión al receptor Fcγ (Bruhns, P., *et al.*, (2009) y Hezareh M., *et al.*, (2001)).

El mAb "simulado" CD137/HeiD1.3 y el mAb² "modelo" CD137-AA/PD-L1 se produjeron mediante expresión transitoria en células HEK293-6E y se purificaron usando columnas de proteína A mAb Select SuRe.

3.3 Actividad de Fcab humanos en formato de mAb² simulado en ensayo de células indicador de NF-κB humano

La actividad funcional de los Fcab anti-CD137 humano madurados por afinidad en formato de mAb² simulado (HeiD1.3) enumerado se ensayó en el mismo ensayo de luciferasa de NF-κB descrito en el **Ejemplo 2.3**. La luminiscencia se midió con un tiempo de integración de 0,5 segundos en un lector de placas con el software Gen5, BioTek. Como se esperaba, ninguno de los Fcab mostró actividad sin reticulación de Proteína L (-XL). Todos los Fcab de CD137 madurados por afinidad mostraron una gran mejora sobre los Fcab de CD137 parentales para los que, aunque positivos en este ensayo, el cálculo de un valor de CE₅₀ no era posible (véase el **Ejemplo 2.3**). FS22-053-008 y FS22-172-003 mostraron la mejor actividad de cada familia con la CE₅₀ más baja (26,34 nM y 32,64 nM, respectivamente) cuando se reticularon con la Proteína L (+XL).

3.4 Actividad de Fcab humanos madurados por afinidad en el formato de mAb² modelo en ensayo de activación de células T DO11.10 humanas

La actividad funcional de los Fcab humanos madurados por afinidad en el formato de mAb² modelo (PD-L1 LALA) se ensayó en un ensayo de activación de células T DO11.10, similar al ensayo descrito en el **Ejemplo 2.4**.

Se produjeron células HEK.mPD-L1 subclonando ADNc que codifica PD-L1 de ratón (SEQ ID NO: 187) en un vector pcDNA5FRT (Life Technologies) usando sitios de restricción KpnI y NotI y transformando los vectores en la línea celular Flip-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 %, 100 µg/ml de Higromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475) y 15 µg/ml de Blastidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) durante 3-4 semanas hasta que se hubieron formado colonias de células transformadas de manera estable. Estas colonias se amplificaron en presencia de 1 µg/ml de Dioxidociclina (Sigma Aldrich, D9891) y se ensayaron para determinar la expresión de PD-L1 usando anticuerpo anti-

PD-L1 de ratón conjugado con PE (MIH5) (BD Biosciences, 558091).

Las células se despegaron usando tampón de disociación celular, se lavaron una vez con PBS y se sembraron en placas 2x10⁵ células en pocillos de una placa de 96 pocillos y luego se incubaron con anticuerpo diluido 1:20 en PBS durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron una vez en PBS y luego se midieron en un citómetro Accuri C6 (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando FlowJoX. Se confirmó de nuevo la expresión de PD-L1 de ratón.

Los 15 clones producidos en el **Ejemplo 3.2** en mAb² CD137/PD-L1 se ensayaron en este ensayo de activación de células T DO11.10. Se prepararon diluciones de mAb² o mAb de control positivo y se añadieron a células DO11.10.hCD137 (7,5x10³ células por pocillo) y células HEK.mPD-L1 (2x10⁴ células por pocillo) o a células DO11.10.hCD137 (7,5x10³ células por pocillo) y células HEK que no se transdujeron para expresar mPD-L1 (2x10⁴ células por pocillo) en una placa de fondo plano de 96 pocillos que se había recubierto durante la noche con 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (clon 17A2, BioLegend, 100208). Después de una incubación de 18 horas, se recogieron los sobrenadantes y se ensayaron con el kit de ELISA para IL-2 de ratón (eBioscience, 88-7024-86) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de placas con el software Gens, 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 (Gens Software, BioTek). La concentración de mL-2 se representó frente al logaritmo de la concentración de mAb² o mAb de referencia y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación log (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism. La activación de las células T se detectó midiendo la liberación de mL-2.

No se observó actividad de células T sin reticulación mediante la unión a células que expresaban PD-L1. Tras la reticulación, todos los mAb² tuvieron una potente actividad de células T como se observa por la liberación de niveles altos de mL-2 y valores de CE₅₀ subnanomolares. Todos los clones distintos de FS22-053-009 y FS22-172-005 tenían una CE₅₀ de menos de 0,3 nM, por lo que fueron tan buenos como, si no mejores que, el control positivo (mAb anti-CD137 humano, G1-AA/20H4.9). La E_{máx} más baja, que es una medida de la activación máxima de células T, y podría ser relevante para una mayor actividad antitumoral de células T *in vivo*, observada fue 7.758 pg/ml que era más alta que el control positivo (mAb anti-CD137 humano, G1-AA/20H4.9).

3.5 Ensayo de activación de células T CD8⁺ humanas primarias

La capacidad de los Fcab para activar CD137 en células T que sobreexpresan CD137 se mostró en el **Ejemplo 3.3**. Para ensayar la actividad de los Fcab sobre células que no se han modificado por ingeniería para sobreexpresar CD137, se necesitó un ensayo de células T humanas primarias. Las células T CD8⁺ citotóxicas activadas son responsables de matar directamente las células cancerosas y expresan CD137 en su superficie celular (Ye *et al.*, 2014). Se sabe que la agrupación de CD137 es esencial para inducir señalización aguas abajo y activación adicional de las células T CD8⁺. Por lo tanto, se usó un ensayo de activación de células T CD8⁺ para evaluar la capacidad de los Fcab (en formato mAb² como se detalla a continuación) para dirigir la agrupación y la posterior señalización aguas abajo de CD137. La activación de las células T CD8⁺ se determinó mediante la liberación de hIL-2.

Para aislar las células T, se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de conos de depleción de leucocitos, un subproducto de las donaciones de plaquetas. Brevemente, los contenidos de los conos de leucocitos se lavaron abundantemente con PBS y se pusieron por encima de un gradiente de Ficoll (Sigma-Aldrich, 1440-02). Se recogieron las PBMC por centrifugación y se recuperaron las células que no cruzaron el gradiente de Ficoll. Las PBMC se lavaron adicionalmente con PBS y los glóbulos rojos remanentes se lisaron mediante la adición de 10 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos 1X (eBioscience, 00-4300-54) según las instrucciones del fabricante. Las células T CD8⁺ se aislaron de las PBMC presentes en el eluyente usando el kit II de aislamiento de células T CD8⁺ (Miltenyi Biotec Ltd, 130-096-495) según las instrucciones del fabricante.

La incubación con un anticuerpo anti-CD3 se usó como una primera señal para dirigir la activación inicial de las células T. Se recubrieron placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos con 8 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (Clon UCHT1, R&D Systems, MAB100-SP) en PBS durante la noche a 4 °C. A continuación, se lavaron las placas 3 veces con 200 µl de PBS.

Para la reticulación basada en células de Fcab de CD137 humanos madurados por afinidad en formato de mAb² modelo de PD-L1, se produjeron células HEK293 que sobreexpresaban PD-L1 humano (HEK.hPD-L1) esencialmente como se describe en el **Ejemplo 5.3**, pero por subclonación del ADNc que codifica la secuencia de PD-L1 humano (SEQ ID NO: 185) en lugar de PD-L1 de ratón. Se sembraron células HEK.hPD-L1 a 2 x 10⁵ células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano recubiertas con anticuerpo anti-CD3 (8 µg/ml) en 100 µl de medio de cultivo de células T (medio RPMI (Life Technologies, 61870-044) con FBS al 10 % (Life Technologies), 1X Penicilina Estreptomycin (Life Technologies, 15140122), Piruvato Sódico 1 mM (Gibco, 11360-070), Hepes 10 mM (Sigma-Aldrich, H0887), L-Glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich, G7513) y 2-mercaptoetanol 50 µM (Gibco, M6250)). Una vez que las células HEK.hPD-L1 o las células HEK que no se transdujeron para expresar hPD-L1 se habían adherido después de 4 horas de incubación, se retiró todo el medio de cultivo de células T y se reemplazó con 100 µl de medio de cultivo de células T que contenía células T a una concentración de 5,0 x 10⁵ células/ml dando como resultado 5,0 x 10⁴ células/pocillo.

Los mAb² se diluyeron en medio de células T a una concentración final 2X comenzando a 500 nM y se llevó a cabo una titulación 1:3. Se añadieron 100 µl de la titulación de mAb² a las células, para un volumen de ensayo total de 200 µl y una concentración 1X de anticuerpo.

El anticuerpo anti-CD137 de control positivo (G1-AA/20H4.9) y el anticuerpo IgG de isotipo de control negativo (G1-AA/HeID1.3) se diluyeron cada uno en medio de células T a una concentración final 2X comenzando a 500 nM que contenía agente de reticulación 500 nM (anti-CH2 humano, producido internamente (Jefferis *et al.*, 1985 y Jefferis *et al.*, 1992) (mG1/MK1A6)) y se llevó a cabo una titulación 1:3. Se añadieron 100 µl de mezcla diluida de anticuerpo de control positivo/reticulante o mezcla de anticuerpo IgG de control negativo/reticulante a las células para un total de 200 µl de volumen de ensayo y 1X de concentración de anticuerpo.

El ensayo se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 72 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se ensayaron con el kit de ELISA para IL-2 humana Ready-SET-Go! (eBioscience, Cat. 88-7025-88) 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 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 (Gen5 Software, BioTek). La concentración de IL-2 humana (hIL-2) se representó 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.

El mAb anti-CD137 humano de control positivo, 20H4.9, muestra un aumento en la liberación de hIL-2 con una CE₅₀ de 0,5 nM cuando se reticula con el anticuerpo anti-hCH2 (mG1/MK1A6). Todos los clones tenían actividad en el ensayo, la mayoría presentaba buena potencia con CE₅₀ subnanomolares. Los mAb² que contenían las Fcab FS22-053-007, FS22-053-008, FS22-053-010, FS22-053-011, FS22-053-012, FS22-172-003, FS22-172-004, FS22-172-005 incitaron la mayor respuesta de células T con las CE₅₀ más bajas en el intervalo de 0,19 a 0,49 nM. Un subconjunto del mAb² (que contenía los Fcab FS22-053-008, FS22-053-011, FS22-053-014, FS22-173-003 y FS22-172-004) también se ensayó sin reticulación por PD-L1 expresado en células HEK y no mostró actividad en este ensayo, como se esperaba. Esto confirma la actividad observada en el ensayo de NF-κB y el ensayo de activación de células T DO11.10.

3.6 Determinación de la especificidad de los Fcab anti-CD 137 humano por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

Se ensayó la especificidad de los Fcab anti-CD137 humano por CD137 humano en comparación con otros miembros de la familia de TNFSFR relacionados. Se ensayaron 8 de los Fcab en formato de mAb² simulado (HeID1.3) y medido por SPR en un Biacore T200 (GE Healthcare) ensayando la unión a otros receptores TNFRSF humanos: CD40, OX40 y GITR. Se usó acoplamiento de amina (kit de acoplamiento de amina, GE Healthcare, BR-1000-50) para recubrir CD40 humano, GITR y OX40 hasta aproximadamente 1.000 RU en chips Biacore CM5 (GE Healthcare, no. de cat. 29149603). Se prepararon diluciones de los Fcab anti-CD137 humano en formato de mAb² simulado (FS22-053-008/HeID1.3, FS22-053-009/HeID1.3, FS22-053-010/HeID1.3, FS22-053-011/HeID1.3, FS22-053-012/HeID1.3, FS22-053-014/HeID1.3, FS22-172-003/HeID1.3, FS22-172-004/HeID1.3) comenzando a 1 µM en tampón HBS-EP+ (BR100669) y se inyectó durante 3 min a 30 µl/min y luego se dejó disociar en tampón durante 4 min. El chip se regeneró mediante inyección de glicina 10 mM pH 2,5 durante 12 s a 30 µl/min. Se usaron anticuerpos específicos para los diferentes miembros de TNFRSF como controles positivos para verificar el recubrimiento del chip Biacore. Los datos se sustrajeron de doble referencia y se analizaron usando el software BIAevaluation 3.2. Los Fcab no se unieron a ninguno de los receptores TNFRSF ensayados, demostrando su especificidad por CD137. Como resultado, no se espera que los Fcab, o mAb² que comprenden los sitios de unión a antígeno de estos Fcab, invitarán la unión fuera de diana a cualquier otra cosa distinta de CD137.

3.7 Afinidad de unión de Fcab anti-CD137 humano en formato de mAb² simulado para CD137 humano, de cynomolgus y de ratón por SPR y generación de FS22-053-017

La afinidad de los Fcab anti-CD137 humano (FS22-053-008, FS22-053-011, FS22-053-014, FS22-172-004, FS22-172-004) en un formato de mAb² simulado (véase el **Ejemplo 3.2**) para CD137 humano, de cynomolgus (cyno) y de ratón se midió mediante SPR, para determinar si los Fcab pueden ser útiles para ensayar en estudios con animales. Se inmovilizó un anticuerpo de captura anti-Fab humano en las cuatro células de flujo de un chip CM5 serie S (GE Healthcare #BR-1005-30) a una densidad superficial promedio de 6.000 RU siguiendo las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare, kit de captura de Fab humano, #28958325). La inmovilización a 25 °C y un caudal de 10 µl/min logró una respuesta final promedio de 6.000 RU. Cada mAb² se capturó a aproximadamente 150 RU inyectando una solución de 3 µg/ml de mAb² diluido en tampón HBS-EP+ (GE Healthcare #BR1006-69) durante 60 segundos a 30 µl/min. Después, diferentes concentraciones de antígeno CD137 humano, de cyno o de ratón (CD137-mFc-Avi humano, de cyno o de ratón no biotinilado o CD137-Avi-His humano) en tampón HBS-EP+ se hicieron fluir sobre el chip durante 3 min a 60 µl/min y después se dejaron disociar durante 10 minutos. Después de cada concentración de antígeno, el chip se regeneró infectando glicina 10 mM pH 2,1 a un caudal de 30 µl/min durante 30 segundos. Se inyectó tampón HBS-EP+ antes de la concentración más alta de antígeno y después de la concentración más baja de antígeno para sustracción de referencia, y una de las concentraciones al azar se repitió dos veces. La cinética de unión se ajustó con un modelo 1:1 de Langmuir para generar constantes de unión en equilibrio (K_D) para cada muestra. El análisis de los datos se realizó con el software BiaEvaluation versión 3.2. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

El análisis de los resultados reveló una unión mejorada tanto para CD137 humano como de cynomolgus por todos los clones madurados por afinidad, en comparación con las moléculas parentales respectivas. La afinidad de unión por los antígenos CD137 humanos monoméricos fue más débil (al menos 100 veces) que por los antígenos dimericos humanos y de fusión con Fc de cyno. Como se analiza en el **Ejemplo 2.1**, los Fcab se seleccionaron para unirse preferiblemente a formas dimericas sobre monoméricas de CD137 y estos datos confirman que la estrategia de selección fue exitosa. Este comportamiento cinético hace que sean menos probables de unirse a CD137 monomérico expresado a niveles mínimos en células T no estimuladas para dar como resultado un riesgo reducido de toxicidades hepáticas o sistémicas asociadas con algunas terapias de anticuerpos monoclonales anti-CD137.

Los datos también muestran que los Fcab anti-CD137 humano se unieron a CD137 dimerico de cynomolgus con afinidad comparable a CD137 dimerico humano.

Tabla 3

Fcab	K _D de CD137 dimerico humano (nM)	K _D de CD137 K dimerico de cynomolgus (nM)	Veces de diferencia de K _D de CD137 monomérico humano con respecto a K _D de dimerico humano	K _D de CD137 dimerico de ratón (nM)
FS22-053	38	34	N/A	N/A
FS22-053-008	4,2	0,9	170 veces	N/A
FS22-053-011	5,5	1,3	>200 veces	N/A
FS22-053-014	3,2	0,9	100 veces	24
FS22-172	52	203	N/A	N/A
FS22-172-003	1,5	1,3	>200 veces	N/A
FS22-172-004	4,3	3,5	>200 veces	N/A

N/A - no aplicable ya que la señal baja no permitió la determinación de la K_D

También se ensayó la capacidad de los Fcab en un formato de mAb² simulado para unirse a CD137 dimerico de ratón. Ninguno de los clones mostró una fuerte unión al antígeno de ratón (como se muestra en la tabla donde N/A indica que no pudo calcularse ninguna K_D) excepto para el clon FS22-053-014 que sorprendentemente se encontró que tenía una K_D de 24 nM para el antígeno de ratón. Esto fue inesperado ya que CD137 de ratón y CD137 humano comparten menos del 57 % de homología de secuencia.

El análisis de secuencia de FS22-053-014 reveló una posibilidad de secuencia potencial que podría dar como resultado una isomerización posterior a la traducción del aspartato en la posición 98 en el bucle EF de su dominio CH3. El aspartato (D) en la posición 98 se mutó a glutamato (E) mediante mutagénesis dirigida al sitio usando el kit de mutagénesis QuickChange II (Agilent, no. de catálogo 200523) según las recomendaciones del fabricante, que produjo el clon FS22-053-017.

Se llevaron a cabo experimentos para confirmar que esta mutación no afectaba negativamente a la afinidad de unión o a la actividad funcional del clon FS22-053-017 en comparación con el clon FS22-053-014.

La constante de disociación en equilibrio (K_D) del clon de Fcab FS22-053-017 se comparó con la del clon FS22-053-014 mediante SPR en un sistema Biacore T200 usando el antígeno CD137-mFc-Avi humano y PD-L1-mFc-Avi de ratón, respectivamente. Los resultados mostraron perfiles cinéticos muy similares al antígeno humano para ambos clones de Fcab, evidenciando de este modo que mutar el aspartato en la posición 98 a un glutamato no tuvo un efecto negativo en la unión al antígeno humano. Los resultados también mostraron que FS22-053-017 mostró una disminución de 2 veces en la fuerza de unión al antígeno CD137 de ratón.

El clon Fcab FS22-053-017 se subclonó y se expresó como un mAb² "simulado" HeID1.3 (véase el **Ejemplo 2.2**) y a continuación se comparó con el clon FS22-053-014, también en formato mAb² HeID1.3, en un ensayo de activación de células T DO11.10 de CD137 humano como se describe en el **Ejemplo 2.4**. Se usó G1-AA/20H4.9 como control positivo anti-CD137 y G1-AA/HeID1.3 como control de IgG. Los mAb² se ensayaron sin reticulación de Proteína L o se reticularon en una relación 1:4 con Proteína L.

Los resultados mostraron que ambos Fcab FS22-053-17 en formato de mAb² simulado y Fcab FS22-053-014 en formato de mAb² simulado tenían una actividad comparable cuando se reticularon por Proteína L en el mismo ensayo de activación de células T DO11.10. Por lo tanto, la mutagénesis llevada a cabo no impactó negativamente en la actividad funcional. Ambos clones en formato de mAb² simulado no tuvieron actividad sin reticulación.

5 3.8 Resumen de la maduración de afinidad y caracterización de los Fcab anti-CD137 humano

En resumen, se generaron Fcab anti-CD137 madurados por afinidad y se prepararon en un formato de mAb², que se caracterizaron a continuación. Los mAb² que contenían estos dominios de unión al antígeno CD137 en el dominio CH3 mostraron altos niveles de actividad en un ensayo de células indicadoras de NF-κB humano y se mostró que esta actividad era dependiente de la reticulación. Los mAb² que contenían el dominio de unión a antígeno de los Fcab FS22-053-008 y FS22-172-003 mostraron la mejor actividad en este ensayo.

Adicionalmente, se mostró que cuando los mAb² se prepararon a partir de estos Fcab, de manera que contenían el dominio de unión al antígeno CD137 y una región Fab de unión a PD-L1, así como la mutación LALA en su dominio CH2 para reducir o anular la unión a receptores Fcγ, los mAb² tuvieron entonces una potente actividad de células T en un ensayo de activación de células T DO11.10 humanas y se mostró que esta actividad era dependiente de la reticulación mediante la unión a células que expresaban PD-L1. También se mostró que los mAb² tenían actividad dependiente de la reticulación en un ensayo de activación de células T CD8⁺ humanas primarias, proporcionando evidencia adicional de que los mAb² que contenían estos dominios de unión al antígeno CD137 madurados por afinidad son capaces de inducir eficazmente el agonismo de CD137 y que esta actividad agonista está condicionada por la reticulación.

También se mostró que los mAb² contenían el dominio de unión al antígeno anti-CD137 humano eran específicos para CD137 y no se unían a otros miembros de TNFRSF. Se mostró que los mAb² se unen preferiblemente al antígeno CD137 dimérico humano sobre el antígeno CD137 monomérico humano. Finalmente, se mostró que estos mAb² se unían a CD137 dimérico de cynomolgus con afinidad comparable a CD137 dimérico humano.

Sorprendentemente, se descubrió que un clon de Fcab, FS22-053-014, también era capaz de unirse a CD137 de ratón. El análisis de secuencia de FS22-053-014 reveló una posibilidad de secuencia potencial, que se corrigió por mutagénesis dirigida a sitio para producir el clon FS22-053-017. La caracterización del FS22-053-017 reveló que retenía propiedades de unión similares y que mostraba una actividad funcional similar en un ensayo de activación de células T DO11.10 de CD137 humano que FS22-053-014.

Habiendo demostrado que los mAb² que contienen el dominio de unión al antígeno anti-CD137 humano requieren reticulación con el fin de agrupar y activar CD137, el siguiente objetivo fue preparar un mAb² que se une a PD-L1 humano además de a CD137. Se propuso la hipótesis de que la unión del mAb² a PD-L1 humano a través de los brazos Fab provocaría la reticulación de las moléculas de anticuerpo, lo que a su vez conduciría a la agrupación y activación de CD137 y que esta activación dependería de la presencia de la expresión de PD-L1 humano.

Con el fin de preparar mAb² que se unen a PD-L1 humano además de a CD137, fue necesario en primer lugar generar mAb que fueran capaces de unirse a PD-L1. La generación de estos mAb se describe a continuación.

Ejemplo 4: Aislamiento de mAb anti-PD-L1 sin activar 280 02 G02

4.1 Selecciones

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.

Se realizaron tres rondas de selecciones en fase sólida con la biblioteca de presentación en fago de anticuerpo IONTAS 1 usando antígeno que se usó para recubrir directamente sobre tubos Nunc de poliestireno como se describe por Schofield *et al.*, 2007. La primera, segunda y tercera ronda de selección emplearon PD-L1-Fc-His humano, PD-L1-rCD4-His de ratón y PD-L1-Fc-His humano, respectivamente (véase el **Ejemplo 1.3** para detalles de los antígenos).

La población seleccionada de anticuerpos anti-PD-L1 de pesada variable (VH) se intercambió con una población de anticuerpos de ligera variable (VL) sin tratamiento previo como se describe por Dyson *et al.*, 2011, y esta población de anticuerpo presentado en fago, rescatada, intercambiada, se empleó en selecciones en fase de solución. En resumen, se realizó la selección y reconocimiento con PD-L1-rCD4-His humano (10 nM), PD-L1-rCD4-His humano (200 pM) y PD-L1-rCD4-His de ratón (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 se determinó mediante un ELISA policlonal de fago realizado según se describe por Dyson *et al.*, 2011, y mostró una mínima reactividad cruzada con PD-1 humano o con rCD4 o etiquetas de Fc.

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

4.2.1 ELISA de scFv monoclonal

La población de scFv de la Selección 280 del **Ejemplo 4.1** 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 ha descrito (Martin *et al.*, 2006; Studier, 2005). Se utilizaron entonces scFv solubles en un ELISA monoclonal con PD-L1-rCD4-His humano inmovilizado como se describe por Schofield *et al.*, 2007. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp (Thermo Fisher Scientific, 437111) con PD-L1-rCD4-His humano (5 µg/ml, PBS) durante la noche, se bloquearon con MPBS al 2 % durante 1 hora y se añadió el sobrenadante del 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 primaria se seleccionaron para análisis adicional.

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

Para identificar los clones que bloqueaban la interacción entre PD-L1 y PD-1, se realizó un ELISA para cribar los scFv de bloqueo. Brevemente, se recubrieron placas Nunc maxisorp (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 PD-1-rCD4-His humano (5 µg/ml en MPBS al 3 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se mezcló previamente PD-L1-Fc-His humano (50 µl, 0,2 nM) con sobrenadante de cultivo de *E. coli* que contenía scFv. Las placas de 96 pocillos Nunc se lavaron 3 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/scFv humana 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 4.2.1** anteriormente, pero usando PD-L1-rCD4-His de ratón inmovilizado en lugar de PD-L1 humano. Esto identificó 50 clones anti-PD-L1 de ratón con reactividad cruzada, que eran candidatos para la conversión al formato de IgG1.

4.2.3 Conversión de los clones de scFv anti-PD-L1 bloqueantes a formato IgG1

Los clones de scFv anti-PD-L1 que bloquearon la interacción entre PD-L1 y PD-1 se convirtieron en formato 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-espín "por lotes de 1 etapa" de Proteus (Generon, GEN-1SB08) según las instrucciones del fabricante. La diálisis 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 a 2 µM por ultrafiltración.

4.2.4 Cribado de la actividad bloqueante de PD-L1-PD-1 en un ensayo de cocultivo indicador Jurkat-NFAT

La actividad funcional de los mAAb anti-PD-L1 purificados se evaluó después en un cribado de ensayo indicador en cocultivo. Este cribado se realizó usando la línea celular Jurkat estable GloTiter 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 retiró el medio y en paralelo se resuspendieron células indicadoras PD-1 Jurkat (Promega, CS187102) en medio de ensayo (RPMI1640 al 90 %, FBS al 1 %). A la placa que contenía células PD-L1 adheridas, 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 celular PD-1. 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 el resultado de la luciferasa usando un lector de placas BMG pherastar. Este anticuerpo identificado G1/280_02_G02 como capaz de bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1 en un ensayo de cocultivo, según lo determinado 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 (intervalo de concentración doble: 200 a 1,56 nM) que dio como resultado una concentración eficaz mitad de la máxima calculada (CE50) de 4,2 nM.

4.3 Optimización de secuencia

El análisis preliminar de la secuencia del anticuerpo G1/280_02_G02 dio como resultado la identificación de un sitio de desamidación potencial en la 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 donde 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 potencia en la actividad bloqueante de PD-L1, y se eligió el clon

variante que contenía la modificación de NS, designado G1/280_02_G02_NS, para su uso en un intercambio de cadena ligera.

4.4 Resumen de selecciones sin tratamiento previo

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

Ejemplo 5: Generación y caracterización de clones anti-PD-L1 que contenían cadena ligera kappa

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

5.1 Selecciones de fagos y estrategia de cribado

20 Se realizaron varias selecciones en solución de presentación en fagos en tres rondas usando antígenos PD-L1-rCD4-His humano biotinilado y PD-L1-rCD4-His de ratón (véase el **Ejemplo 1.3** para detalles de los antígenos). 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".

25 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 recubierto a 3 µg/ml en PBS Dulbecco, 50 µl, en placas Maxisorb) usando el ensayo descrito en el **Ejemplo 4.2.1** anterior empleando la solución de potenciación DELFIA.

30 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 en los 5° día después de la transfección para un cribado adicional en formato de IgG1.

5.2 Cribado por SPR

35 Los 48 anticuerpos se clasificaron por afinidad usando SPR (instrumento Biacore T200). Para la clasificación, los sobrenadantes diluidos (1:10 en tampón de ejecución compuesto por 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 sobre la superficie preparada a una concentración de 50 nM. Las constantes de asociación (k_a) y disociación (k_d) generadas usando esta inyección única se usaron para determinar la constante de disociación (K_D). Los valores de K_D de los clones se compararon con los del clon G1/280_02_G02_NS en formato Ig1 (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.

45 Brevemente, se realizaron experimentos de SPR usando un instrumento BiAcore 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 a partir de 50 nM a un caudal de 30 µl/min, (Intervalo 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 las celdas 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 intercambio de cadenas ligeras kappa descrito en el **Ejemplo 5.1** permitió que la cadena pesada del anticuerpo G1/280_02_G02_NS se emparejara no solo 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.

5.3 Caracterización de clones kappa en formato IgG1

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

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 PD-1 y PD-L1 se evaluó en un ensayo bioluminiscente basado en células usando un producto de bioensayo de bloqueo de PD-1/PD-L1 (Promega, J1250/J1255) según las recomendaciones del fabricante. La actividad bloqueante se comparó con el clon G1/280_02_G02_NS.

Brevemente, todos los anticuerpos se purificaron como se describe en el **Ejemplo 4.2.3** y se ensayaron a diluciones de 3 veces de 100 nM a 35 pM (ocho concentraciones) por duplicado. Se mostró que todos los clones ensayados eran potentes inhibidores de la interacción PD-1/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 que mostraban incluso valores mejores de CI_{50} que el clon G1/280_02_G02_NS que contenía la cadena ligera lambda.

5.3.2 Afinidades

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

Brevemente, los mAb anti-PD-L1, diluidos en tampón HBS-EP (GE Healthcare, BR100188) a 2 µg/ml, se inyectaron individualmente en las celdas de flujo 2, 3 y 4 de un chip de Proteína A (GE Healthcare, 29127556) a 30 µl/min para lograr una respuesta final de aproximadamente 110 RU. Los antígenos PD-L1-His humano recombinante, de cynomolgus y de ratón, diluidos en tampón HBS-EP, se inyectaron en la celda de flujo 1, 2, 3 o 4 según fuera apropiado en un intervalo de concentración de 81 nM a 0,037 nM con diluciones de 3 veces durante 4 min a 75 µl/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 seg a una velocidad de 30 µl/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 R_{max} de los perfiles de unión humanos correspondientes.

Los datos de unión demostraron que el clon G1-AA/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 o subnanomolares de un solo dígito y tenían una reactividad cruzada completa humano/de cynomolgus. En comparación con el clon G1-AA/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 iban 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 G1-AA/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.

5.3.3 Unión de los mAb anti-PD-L1 a PD-L1 expresado en células

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 expresan PD-L1 humano (células HEK.hPD-L1) 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).

Se subclonó el ADNc que codifica PD-L1 humano (SEQ ID NO: 185) 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 %, 100 µg/ml de Higromicina B (Melford Laboratories Ltd, Z2475) y 15 µg/ml de Blastidina (Melford Laboratories Ltd, B1105) durante 3-4 semanas hasta que se hubieron formado colonias de células transformadas de manera estable. Estas colonias se amplificaron en presencia de 1 µg/ml de doxiciclina (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 medir 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.

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

5.3.4 Actividad de los mAb anti-PD-L1 en el ensayo de reacción de linfocitos mixtos

La actividad de los mAb anti-PD-L1 se ensayó en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR). Un ensayo 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 de puntos de control inmunitarios, el ensayo de MLR puede usarse para confirmar que la activación de las células T se potencia por el mAb en un sistema humano.

Generación de células T CD4⁺ expandidas

Se aislaron PBMC de conos de leucocitos mediante separación en gradiente de Ficoll. Las células T CD4⁺ se aislaron 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 en vórtex. 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 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 IL-2 humana recombinante (Peprotech, 200-02-50 µg) con una relación de perla a célula 3:1 se transfirieron a un matraz T75 (Greiner Bio-one, 690195) y se incubaron a 37 °C + CO₂ al 5 %. Después 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 rhIL-2) según sea necesario. El día 7 u 8, se retiraron las perlas de 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 rhIL-2 reducido. Las células se almacenaron congeladas hasta que se requirieron.

Diferenciación de iDC

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.

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 µl 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 y 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. Tanto 1×10^4 células iDC suspendidas en 50 µl de medio AIM V como 1×10^5 células T CD4⁺ expandidas suspendidas en 100 µl de medio AIM V se añadieron 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 medio AIM V solamente. Se recogieron los sobrenadantes, se diluyeron las muestras (1:25) y se midieron las concentraciones de interferón gamma (IFN-γ) usando ELISA de IFN gamma humano Kit 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 (Gen5 Software, BioTek). La concentración de IFN-γ humano se representó 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.

Los mAb anti-PD-L1 humano, G1/894_8_E05, G1/887_4_E12 y G1/887_4_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 ($E_{m\max}$) mayor de 10.000 pg/ml. La CE_{50} indica la concentración de mAb a la que se alcanza la mitad de la respuesta, mientras que $E_{m\max}$ es un valor absoluto que indica la concentración máxima de IFN-γ conseguida en el ensayo. No se observó actividad con el mAb G1-AA/4420 de control negativo, como se esperaba.

5.4 Actividad de los 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_4_G12 y G1/894_08_E05 mostraron una reactividad cruzada débil con PD-L1 de ratón (véase el **Ejemplo 5.3.2**), se examinó su actividad funcional hacia PD-L1 de ratón en un ensayo de liberación de interleucina-2 (IL-2) basado en las líneas celulares de hibridoma de linfocitos T OVA

DO11.10 y LK35.2 B. La liberación de IL-2 es un marcador de la activación de las células T. Las células T que expresan PD-1 murino endógeno se transfectaron con vector vacío (pLVX). Las células B se transfectaron con una construcción de PD-L1 de ratón.

5.4.1 Producción de líneas de células T con un vector vacío

Se usó 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) (No. de Cat. 631253) se cotransfectó con una mezcla de empaquetamiento Lenti-X HTX en la línea celular Lenti-X 293T (No. de Cat. 632180) para generar virus. La línea celular DO11.10 se transdujo usando las partículas lentivirales producidas con el sistema de empaquetamiento Lenti-X HTX.

5.4.2 Producción de células presentadoras de antígeno que sobreexpresan PD-L1

Se usó metodología de transducción lentiviral para generar células de linfoma de células B LK35.2 (ATCC, HB-98) que sobreexpresaban PD-L1 de ratón usando el sistema de empaquetamiento Lenti-X HTX (No. de Cat. 631249). El vector de expresión Lenti-X (pLVX) (No. de Cat. 631253) que contenía ADNc que codificaba PD-L1 de ratón (SEQ ID NO: 187) se cotransfectó con una mezcla de empaquetamiento Lenti-X HTX en la línea celular Lenti-X 293T (No. de Cat. 632180) para generar virus. La línea celular LK35.2 se transdujo usando los vectores lentivirales producidos con el sistema de empaquetamiento Lenti-X HTX.

5.4.3 Ensayo de activación de células T DO11.10 de ratón

Se prepararon diluciones de los mAb anti-PD-L1 G1/887_04_E12, G1/887_4_G12 y G1/894_08_E05 o el mAb de control negativo anti-FITC (G1-AA/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-ISQAVHAAHAEINEEAGR-OH (SEQ ID NO: 192) (Pepscan)) (100 μ L de células LK35.2 mPD-L1 (hibridoma de células B transducido con un vector lentiviral que contiene mPD-L1 para sobreexpresar PD-L1 de ratón)/mezcla de 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)/ml en 100 μ L de volumen de medio experimental a 100 μ L de la mezcla de mPD-L1/(mAb) LK35.2. Las células se mezclaron después antes de incubarse 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 (Gen5 Software, BioTek). La concentración de IL-2 de ratón se representó 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 mAb anti-PD-L1 humano mostraron una actividad significativa en el ensayo de activación de células T de ratón con potencias (CE₅₀) en el intervalo 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, también fue el clon 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.

5.5 Resumen para 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 para 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 clon 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* y que tenían reactividad cruzada funcional en ratones.

Ejemplo 6: Optimización de secuencia de los mAb de PD-L1

6.1 Identificación y eliminación de sitios de desamidación de proteínas potenciales

El análisis de la secuencia del clon G1/280_02_G02_NS dio como resultado la identificación de la secuencia NSNT en el bucle H-CDR2 (en las posiciones 54-57 de Kabat) como un sitio de desamidación potencial, que si se desamidaba 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 5**, así que este sitio de desamidación potencial también estaba presente en los clones 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 NSNT se cambió en los cuatro clones que contenían la cadena ligera kappa mediante mutagénesis dirigida a sitio a GGST, SGGT o SGNA para producir los clones variantes identificados. Al mismo tiempo que se elimina 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 intercambio 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. Los clones parentales y variantes resultantes (todos en formato IgG1) se transfectaron a una escala de 0,8 ml, y los sobrenadantes de cultivo recogidos cinco días después de las transfecciones se usaron para determinar las afinidades de los clones por PD-L1-rCD4-His humano y de cynomolgus por SPR. Se generó cyno PD-L1-rCD4-His como se describe en el **Ejemplo 1.3**. Con la excepción de los clones variantes derivados del clon G1/887_04_E12, todos los clones variantes conservaron sus afinidades subnanomolares por PD-L1 humano y de cynomolgus en comparación con su clon parental respectivo.

Los clones modificados derivados de los clones parentales G1/894_08_A05, G1/894_08_E05 y G1/887_04_G12 mostraron afinidades subnanomolares para PD-L1 humano y de cynomolgus comparables a las de su clon parental respectivo, lo que indica que las sustituciones GGST, SGGT y SGNA se toleraban bien. 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, SGGT y SGNA en H-CDR2. Fue sorprendente que este residuo de prolina en el clon G1/887_04_E12 parecía ser importante para 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 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 estaba más próxima a la secuencia de la línea germinal.

Usando mutagénesis dirigida a sitio, también se modificó el sitio de desamidación potencial (NSNT en la posición 54 a 57 de Kabat) en el bucle H-CDR2 del clon G1/280_02_G02_NS a SGGT. 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/lam-G02v3 que contenía la cadena ligera lambda, que también se seleccionó para una caracterización adicional.

Ejemplo 7: Caracterización de los mAb

7.1 Clonación y producción de clones en formato mAb

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 6** 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 de 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/lam-G02v3) identificados en el **Ejemplo 6** 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 G1-AA/E12v2, G1-AA/E05v2, G1-AA/G12v2 y G1-AA/lamG02v3 (denominados G1-AA/lamG02v3 o G1-AA/lambdav3). Las secuencias de cadena pesada y ligera se muestran respectivamente en la SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 para G1-AA/E12v2, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 para G1-AA/E05v2, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 33 para G1-AA/G12v2 y SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 44 para G1-AA/lam-G02v3.

7.2 Afinidades de mAb por PD-L1 humano y de cynomolgus

Para determinar si las modificaciones de secuencia adicionales presentes en G1-AA/lam-G02v3 (es decir, NSNT a SGGT en la VH-CDR2, NS a NY en la VL-CDR1 y la mutación LALA) y los mAb que contienen la cadena ligera kappa G1-AA/E12v2, G1-AA/E05v2 y G1-AA/G12v2 (es decir, la mutación LALA y, en el G1-AA/E12v2 solo, treonina a prolina en la posición 28 de Kabat en la región VH) tenían afectadas la cinética de unión, se determinaron las afinidades de estos mAb anti-PD-L1 para PD-L1 humano y de cynomolgus como se describe en el **Ejemplo 5.3.2**. Los mAb G1-AA/lam-G02v3, G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 y G1-AA/G12v2 exhibieron afinidades por PD-L1 humano y de cynomolgus similares a las observadas en el **Ejemplo 5.3** para los mAb G1-AA/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 G1-AA/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). Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

El VH del mAb G1-AA/E12v2 difiere de la región de G1/929_01_A02 (**Ejemplo 6**) por un residuo, 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 G1-AA/E12v2, estos datos demuestran la importancia del residuo de prolina en la posición 28 en la VH del clon E12v2 (nomenclatura de Kabat) por su afinidad por PD-L1 humano y de cynomolgus.

Tabla 4

Clon	K _D de PD-L1-His K humano (nM)	K _D de PD-L1-His de cyno (nM)
G1-AA/lam-G02v3	1,34	2,45
G1-AA/E05v2	0,50	0,89
G1-AA/E12v2	0,21	0,37
G1-AA/G12v2	0,44	0,75

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

Los mAb anti-PD-L1, G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 y G1-AA/G05v2 se ensayaron en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) como se describe en el **Ejemplo 5.3.4**. Se usó G1-AA/4420 como control negativo. Los datos resultantes se muestran en la **Tabla 5**. Los mAb G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 y G1-AA/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 (E_{máx}) mayor de 600 pg/ml (**Tabla 5**). Los valores de CE₅₀ y especialmente de E_{máx} eran significativamente diferentes de los descritos en el **Ejemplo 5.3.4**. 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 5.3.4**, como lo fue la clasificación de los clones por orden de potencia. No se observó ninguna actividad para el mAb G1-AA/4420 de control negativo, como se esperaba.

Tabla 5

Clon	Actividad funcional en el ensayo de MLR	
	CE ₅₀ (nM)	E _{máx} (pg/ml)
G1-AA/E05v2	0,047	632
G1-AA/E12v2	0,054	666
G1-AA/G12v2	0,040	686
G1-AA/4420, control negativo	Sin actividad	

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

Los mAb G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 y G1-AA/G12v2 se produjeron a escala de laboratorio y se caracterizaron por los métodos analíticos estándar de SEC y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

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

Las secuencias de ADN que codifican los mAb G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 y G1-AA/G12v2 se transfectaron en células HEK293 6E (National Research Council Canadá) usando PEIpro (Polyplus, Francia). Después de 5 días, se recogieron los fluidos del cultivo celular y se purificaron en columnas preempaquetadas de Proteína A MabSelect usando un instrumento AKTApure (ambos de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). El equilibrio 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.

7.4.2 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 UPLC de Acquity Clase H Bio (Waters Corp. Reino Unido) para medir el porcentaje de monómero. Se usó una columna de SEC de Acquity UPLC BEH200 de 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).

7.4.3 Termoestabilidad

La temperatura de fusión (T_m) de G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 y G1-AA/G12v2 se midió usando un calorímetro diferencial de barrido capilar Microcal VP (DSC). Se incluyó G1-AA/lam-G02v3 para evaluar la diferencia entre los mAb que contienen 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 informó de un valor.

Tabla 6

mAb	Pureza del monómero después de la Proteína A %	T_m de Fab/CH3
G1-AA/E05v2	99,48 ± 0,01 %	80,4-82,8 °C
G1-AA/E12v2	98,85 ± 0,07%	81,4-84,1 °C
G1-AA/G12v2	99,83 ± 0,11%	78,1-81,3 °C
G1-AA/lam-G02v3	99,75 ± 0,25%	68,1 °C

Un resumen de los resultados se muestra en la **Tabla 6**. Los tres mAb: G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2 y G1-AA/G12v2 mostraron parámetros de caracterización analítica favorables; la pureza del monómero después de la 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 G1-AA/E12v2 pareciendo ser el más estable térmicamente (T_m de Fab/CH3= 81.484.1 °C). El mAb de cadena ligera lambda, G1-AA/lamG02v3, tenía una T_m más baja que los tres mAb que contenían cadena ligera kappa.

Ejemplo 8: Producción y caracterización de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano

8.1 Producción de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano

Los anticuerpos mAb² de CD137/PD-L1 que consistían en moléculas de IgG1 que comprendían los 3 clones de Fcab anti-CD137 humano FS22-053-008, FS22-053-017 y FS22-172-003 (véase el **Ejemplo 3**) se produjeron para permitir la caracterización de los Fcab en un formato de mAb². Los mAb² de CD137/PD-L1 se prepararon sustituyendo parte de los Fcab del dominio CH3 que comprendían los bucles AB, CD y EF por la región correspondiente del dominio CH3 de uno de los tres anticuerpos de unión anti-PD-L1 (G1-AA/E05v2, G1-AA/E12v2, G1-AA/G12v2; véase el **Ejemplo 7.1**). Todos los mAb² resultantes contenían la mutación LALA. Los mAb² de CD137/PD-L1 se expresaron transitoriamente con la ayuda de PEIpro (Polyplus, Francia) en células HEK293 6E (NRCC, Canadá). Después de 5 días, se recogieron los fluidos del cultivo celular y se purificaron en columnas preempaquetadas de Proteína A MabSelect usando un instrumento AKTExpress (ambos de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). El equilibrio de las columnas se llevó a cabo en Tris-HCl 50 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0 seguido de carga con fluido de cultivo celular recogido. La resina se sometió entonces a lavado en Tris-HCl 50 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0 seguido de elución del mAb² usando tampón a pH < 3,5.

Para evaluar la cantidad de proteína producida, se cuantificó el contenido de proteína IgG mediante interferometría de biocapa usando la plataforma Octet QKe (ForteBio) con biosensores de cuantificación de Proteína A de PALL (18-5021). Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad de Proteína A usando columnas mAb SelectSure. Se purificaron nueve mAb² usando columnas de Proteína A mAb Select SuRe (GE Healthcare, 11003494). Los resultados se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7

mAb ² para CD137/PD-L1				
Fcab de CD137	Fab de PD-L1	mAb ²	Título en expresión transitoria de HEK (mg/l)	Rendimiento (Proteína A)
FS22-053-008-AA	E05v2	FS22-053-008-AA/E05v2	88	69 %
FS22-053-008-AA	E12v2	FS22-053-008-AA/E12v2	113	74 %
FS22-053-008-AA	G12v2	FS22-053-008-AA/G12v2	108	88 %
FS22-053-017-AA	E05v2	FS22-053-017-AA/E05v2	61	88 %
FS22-053-017-AA	E12v2	FS22-053-017-AA/E 12v2	198	65 %
FS22-053-017-AA	G12v2	FS22-053-017-AA/G12v2	89	81 %
FS22-172-003-AA	E05v2	FS22-172-003-AA/E05v2	127	82 %
FS22-172-003-AA	E12v2	FS22-172-003-AA/E12v2	260	76 %
FS22-172-003-AA	G12v2	FS22-172-003-AA/G12v2	229	69 %

Todos los 9 anticuerpos mAb² de CD137/PD-L1 se produjeron mediante expresión transitoria en HEK 293 6E y se obtuvieron títulos y rendimientos de purificación de proteína A dentro del intervalo típico esperado a escala de laboratorio. También se expresó FS22-172-003-AA-lam/G02v3 y se purificó para ensayo adicional.

8.2 Caracterización biofísica de mAb² por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y SDS-PAGE

8.2.1 Análisis por SE-HPLC

La SE-HPLC después de la purificación se realizó en un HPLC de Agilent serie 1100 (Agilent, Reino Unido), equipado con una columna TSK-GEL SUPERSW3000 4,6 mm de DI x 30,0 cm (Tosoh Bioscience) usando fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 200 mM, pH 6,8 como fase móvil. La cuantificación del % de monómero se realizó usando el software Chemstation (Agilent, Reino Unido).

8.2.2 Análisis por CE-SDS

El análisis por CE-SDS se realizó en un Sistema de Electroforesis Capilar 2100 Bioanalyzer (Agilent, Reino Unido), según las instrucciones del fabricante. Para las condiciones reductoras, se añadió DTT y las muestras se desnaturalizaron a 70 °C durante 5 minutos.

Tabla 8

mAb ²	CE-SDS reducida Suma del % de cadena pesada + % de cadena ligera	SEC-HPLC % de monómero
FS22-053-008-AA/E05v2	99,7 %	99,6 %
FS22-053-008-AA/E12v2	99,8 %	98,9 %
FS22-053-008-AA/G12V2	No ensayado	62,6 %
FS22-053-017-AA/E05v2	99,8 %	99,5 %

mAb ²	CE-SDS reducida Suma del % de cadena pesada + % de cadena ligera	SEC-HPLC % de monómero
FS22-053-017-AA/E12v2	99,7 %	99,6 %
FS22-053-017-AA/G12V2	99,0 %	99,6 %
FS22-172-003-AA/E05v2	99,2 %	99,1 %
FS22-172-003-AA/E12v2	99,7 %	97,9%
FS22-172-003-AA/G12v2	99,6 %	99,3 %

Se muestra un resumen de los resultados analíticos en la **Tabla 8**. Todos los mAb², excepto FS22-053-008-AA/G12v2, mostraron una alta pureza después de la purificación usando Proteína A; un bajo nivel de agregación y fragmentación soluble como se mostró por el % de monómero después de la proteína A > 95 % y una alta pureza por CE-SDS reducida (> 95 %, suma de % de cadena pesada y % de cadena ligera). El FS22-053-008-AA/G12v2 mostró agregación después de la purificación por la Proteína A y, como resultado, no progresó más.

Ejemplo 9: Caracterización de la unión de los mAb²

9.1 Afinidad de unión de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano para PD-L1 humano y de cynomolgus por SPR

Después, se midió la unión de los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, FS22-172-003-AA/lam-G02v3, FS22-172-003-AA/E05v2, FS22-053-008-AA/E05v2, FS22-172-003-AA/E12v2, FS22-053-008-AA/E12v2 y FS22-172-003-AA/G12v2 a antígenos PD-L1 recombinantes humanos y de cynomolgus mediante SPR usando una unidad de procesamiento Biacore T200 (GE Healthcare).

Brevemente, los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, diluidos en tampón HBS-EP (GE Healthcare, BR100188) a 2 µg/ml, se inyectaron individualmente en las celdas de flujo 2, 3 y 4 de un chip de Proteína A (GE Healthcare, 29127556) a 30 µl/min para lograr una respuesta final de aproximadamente 110 RU. Se usaron dos antígenos PD-L1 humanos recombinantes diferentes, es decir, hPD-L1-His-Avi (véase el **Ejemplo 1.3** para detalles del antígeno) y hPD-L1-Avi-His biotinilado (Acrobiosystems PD-1-H82E5). Los antígenos PD-L1-His (Acrobiosystems PD-1-C52H4) humanos y de cynomolgus, diluidos en tampón HBS-EP, se inyectaron en la celda de flujo 1, 2, 3 o 4 según fuera apropiado en un intervalo de concentración de 81 nM a 0,037 nM con diluciones de 3 veces durante 4 min a 75 µl/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 seg a una velocidad de 30 µl/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.

Tabla 9

Clon	K _D de PD-L1-His humano (nM)	K _D de PD-L1-His de cynomolgus (nM)
FS22-172-003-AA/lam-G02v3	1,54	1,91
FS22-172-003-AA/E05v2	0,50	0,59
FS22-172-003-AA/E12v2	0,19	0,36
FS22-172-003-AA/G12v2	0,49	0,53
FS22-053-008-AA/E05v2	0,47	0,58
FS22-053-008-AA/E12v2	0,19	0,25

Los datos de unión demostraron que cada uno de los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano se unieron a PD-L1 humano y de cynomolgus con afinidades de bajas a subnanomolares y, por tanto, presentaron reacción cruzada humana/cynomolgus (**Tabla 9**). Todos los clones de mAb² se unieron a PD-L1 humano y de cynomolgus igualmente bien con valores de KD equivalentes para cada antígeno.

5 9.2 Afinidad de unión de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano para CD137 humano y de cynomolgus mediante SPR

La unión de los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano a antígenos CD137 diméricos recombinantes humanos y de cynomolgus por SPR usando una unidad de procesamiento Biacore T200 (GE Healthcare).

10 Brevemente, se recubrieron 20 µg/ml de anticuerpo anti-Fab humano (GE Healthcare, kit de captura de Fab humano 28958325) en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4 de un chip CM5 sensor Biacore S (GE Healthcare, BR100530) logrando una respuesta final de aproximadamente 5.000 RU. Los clones de mAb², diluidos en tampón HBS-EP (GE Healthcare, BR100188) a 2-5 µg/ml, se inyectaron individualmente en las celdas de flujo 2, 3 y 4 a 30 µl/min para lograr una respuesta de aproximadamente 70 RU (200 RU para FS22-172-003-AA/E12v2). Los antígenos diméricos recombinantes, CD137-mFc-Avi humano o CD137-mFc-Avi de cynomolgus (véase el **Ejemplo 1.1** para detalles de los antígenos) diluidos en tampón HBS-EP, se inyectaron en la celda de flujo 1, 2, 3 o 4 según fuera apropiado en un intervalo de concentración de 81 nM a 0,037 nM con diluciones de 3 veces durante 4 minutos a 70 µl/min y luego se dejaron disociar en tampón durante 10 minutos. La regeneración se logró inyectando glicina 10 mM pH 2,1 (GE Healthcare, kit de captura de Fab humano 28958325) durante 60 segundos a una velocidad de 30 µl/min. El análisis de los datos se realizó como se describe en el **Ejemplo 9.1**.

Tabla 10

Clon de mAb ²	K _D de CD137-mFc-Avi humano (nM)	K _D de CD137-mFc-Avi de cyno (nM)
FS22-172-003-AA/lam-G02v3	1,3	2,2
FS22-172-003-AA/E05v2	1,5	1,0
FS22-172-003-AA/E12v2	0,7	0,8
FS22-172-003-AA/G12v2	2,2	1,8
FS22-053-008-AA/E05v2	2,8	1,1
FS22-053-008-AA/E12v2	2,6	0,6

20 Los datos de unión demostraron que los clones de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano se unieron a CD137 dimérico humano y de cynomolgus con afinidades nanomolares bajas y presentaron reactividad cruzada completa humano/de cynomolgus (**Tabla 10**). Como se esperaba, estos resultados fueron similares a los datos de unión notificados para estos clones de Fcab en formato de mAb² "simulado" (**Tabla 3, Ejemplo 3.7**). La mayor afinidad por CD137 dimérico se observó para FS22-172-003-AA/E12v2, cuya afinidad también se ensayó posteriormente contra CD137-His-Avi monomérico usando el mismo método que se ha descrito anteriormente. No se detectó unión de FS22-172-003-AA/E12v2 a CD137 monomérico hasta 81 nM, lo que ilustra que las regiones de unión de Fcab de los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano tienen una baja afinidad por CD137 monomérico. Estos resultados son similares a los observados también para los Fcab de CD137 FS22-053-008 que muestran que la conversión del Fcab a un formato de mAb² dio como resultado un pequeño cambio en la unión a CD137.

9.3 Determinación de la especificidad de los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano mediante SPR

9.3.1 Especificidad por PD-L1 humano

35 Para analizar la especificidad del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, se ensayó la unión de seis mAb² (FS22-172-003-AA/lam-G02v3, FS22-172-003-AA/E05v2, FS22-053-008-AA/E05v2, FS22-172-003-AA/E12v2, FS22-053-008-AA/E12v2 y FS22-172-003-AA/G12v2) a otras dianas de células T usando SPR. El objetivo fue demostrar la especificidad, mostrando la ausencia de unión de los mAb² a los antígenos PD-L2, CD80, PD-1 y B7-H3 a una concentración de 1 µM.

Se inmovilizaron las celdas de flujo en chips CM5 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, SEQ ID NO: 193), PD-L1-Fc (R&D Biosystems, 156-B7) y PD-L1-His (Acrobiosystems PD-1-H83F3). La celda de flujo 1 se dejó para la inmovilización del blanco. Los mAb² se diluyeron a 1 μ M y 1 nM en 1x tampón 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 inyectaron anticuerpos 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.

Todos los mAb² ensayados mostraron un alto nivel de especificidad con menos de 10 RU de unión de mAb² a los cuatro antígenos detectados a 1 μ M en comparación con un intervalo 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 demostraron el alto nivel de especificidad de los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano para PD-L1 sin unión a las otras dianas de células T enumeradas.

9.3.2 Especificidad por CD137 humano

Se espera que la especificidad del resto de unión Fcab de CD137 se retenga en los mAb² de CD137/PD-L1 cuando se comparan con el mAb² de CD137/HeID1.3 (véase el **Ejemplo 3.6**). La especificidad de FS22-172-003-AA/E12v2 por los miembros de la familia TNFR, OX40, GITR, CD40 y DR6 (R&D Biosystems) se analizó por SPR de manera similar a como se describe en el **Ejemplo 9.3.1**. A una concentración de 1 μ M, FS22-172-003-AA/E12v2 se unió con menos de 7 RU a OX40 humano, GITR, CD40 y DR6 en comparación con 278 RU a CD137-mFc humano. Este resultado demuestra el alto nivel de especificidad del mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 para CD137.

9.4 Unión simultánea de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano a PD-L1 humano y CD137 humano por SPR

La capacidad del mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 para unirse simultáneamente a CD137 humano y PD-L1-His Avi humano (véase el **Ejemplo 1.3** para los detalles de los antígenos) se ensayó mediante SPR en un Biacore T200. Se usó G1/S70 como control. Se inmovilizó PD-L1 His humano, diluido a 10 μ g/ml en tampón de acetato de sodio pH 5,0 (GE Healthcare, 18-1069), en un chip de sensor S CM5 (GE Healthcare, BR100530) a una densidad superficial de aproximadamente 1.100 RU. Una celda de flujo se activó y se desactivó sin ninguna proteína inmovilizada para la sustracción del fondo. Los anticuerpos, diluidos a 5 μ g/ml en tampón HBS-EP, se capturaron a un caudal de 30 μ l/min para lograr una densidad de aproximadamente 200-300 RU. La unión de CD137-mFc-Avi humano se ensayó a 0 y 100 nM durante 5 min a 30 μ l/min, seguido de una etapa de disociación de 2,5 min. El chip sensor se regeneró después de cada ciclo con NaOH 20 mM durante 60 segundos a un caudal de 30 μ l/min. El FS22-172-003-AA/E12v2 fue capaz de unirse simultáneamente tanto a PD-L1 humano como a CD137 humano, mientras que el control G1/S70 solo se unió a PD-L1 humano.

9.5 Afinidad de unión de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano a PD-L1 humano o de cynomolgus expresado en la superficie celular mediante citometría de flujo

Para evaluar la unión del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano a PD-L1 humano y de cynomolgus en la superficie celular, se generaron células HEK293 que sobreexpresaban PD-L1 humano. Se produjeron células HEK293 que sobreexpresaban PD-L1 humano (HEK.hPD-L1) como se describe en el **Ejemplo 5.3.3**. También se produjeron células HEK293 que sobreexpresaban PD-L1 de cynomolgus (HEK.cPD-L1) como se describe en el **Ejemplo 5.3.3**, excepto que el ADNc que codificaba PD-L1 de cynomolgus (SEQ ID NO: 189) se subclonó en el vector pcDNA[™] 5/FRT en lugar de la secuencia de PD-L1 humano.

El mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, FS22-172-003-AA/E12v2, se ensayó después para determinar su unión a células HEK293 que expresaban PD-L1 humano o de cynomolgus 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). Las afinidades de unión se compararon con un anticuerpo de control positivo G1-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 16 y 17 para la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente), cuyos dominios variables se clonaron y expresaron en el formato de IgG1 humana que comprendía la mutación LALA en el dominio CH2 (formato G1-AA).

Se prepararon suspensiones de HEK293, HEK.hPD-L1 y HEK.cPD-L1 en tampón FACS (DPBS (Gibco, 14190-094) que contenía BSA al 0,5 % (Sigma, A7906)) y se sembraron a 1×10^5 célula/pocillo en 100 μ l en placas de 96 pocillos de fondo redondo (VWR, 734-1797). Las células se lavaron una vez en tampón FACS. Los mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, mAb² simulado FS22-172-003-AA/HeID1.3, mAb G1-AA/E12v2 y mAb G1-AA/4420 de control negativo se diluyeron (400 nM - 0,005 nM, diluciones de 5 veces) en 100 μ l de tampón FACS. 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 tampón FACS. A continuación, se añadieron 100 μ l/pocillo de anticuerpo secundario (anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 anti-IgG humana de cabra, Invitrogen, A21445) diluido 1:1.000 en tampón FACS, se incubó durante 20 minutos a 4 °C y las células se lavaron de nuevo con tampón FACS y se resuspendieron en 100 μ l de PBS que contenía 7AAD (1:1.000, Biotium, 40043) antes de analizar usando un citómetro de flujo Canto II (BD Bioscience). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de APC (638 nm 660/20). Los valores de

media geométrica de intensidad de fluorescencia (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.

Se encontró que el mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 y el anticuerpo G1-AA/E12v2 se unían a PD-L1 humano en la superficie celular con valores de CE₅₀ en el intervalo de 3,1 - 3,7 nM y PD-L1 de cynomolgus en la superficie celular con valores de CE₅₀ en el intervalo de 0,6 - 0,7 nM (véase la **Tabla 11**) No se observó unión a células HEK293 que carecían de sobreexpresión de PD-L1 lo que muestra la especificidad de la unión. Por lo tanto, el mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 ensayado se unió específicamente a PD-L1, sin observarse unión no específica. Estos resultados muestran que se retiene la especificidad para PD-L1 humano y de cyno observada para el mAb de PD-L1 (véase el **Ejemplo 5.3.3**).

Tabla 11

		CE ₅₀ de FS22-172-003-AA/E12v2 (nM)	CE ₅₀ de G1-AA/E12v2 (nM)
PD-L1 humano	CE ₅₀ (nM)	3,7 ± 0,4	3,1
PD-L1 de cynomolgus	CE ₅₀ (nM)	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3

9.6 Afinidad de unión de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano a CD137 humano o de cynomolgus expresado en la superficie celular mediante citometría de flujo

Se produjeron células DO11.10 (National Jewish Health) que expresaban CD137 humano de longitud completa (SEQ ID NO: 185) o de cynomolgus (SEQ ID NO: 189), designadas 'DO11.10.hCD137' y 'DO11.10.cCD137' respectivamente, con el fin de presentar el antígeno en una conformación unida a membrana, más similar a su forma natural, para la caracterización adicional de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano seleccionados. Los detalles de la producción de células DO11.10.hCD137 y DO11.10.cCD137 y la confirmación de la expresión se describen en el **Ejemplo 1.2**.

El mAb² anti-CD137/PD-L1 humano FS22-172-003-AA/E12v2 se ensayó para determinar la unión a células que expresaban CD137 humano de cynomolgus (DO11.10.hCD137 o DO11.10.cCD137) usando citometría de flujo. La unión no específica también se evaluó ensayando la unión a células DO11.10 que carecían de expresión de CD137. Los dominios variables de MOR7480.1 (Patente de EE. UU. No. 2012/0237498) se clonaron y expresaron en formato de IgG1 humana que comprendía la mutación LALA en el dominio CH2 (formato G1-AA) y se usó como control positivo.

Brevemente, se prepararon suspensiones de DO11.10, DO11.10.hCD137 o DO11.10.cCD137 en tampón FACS (que contenía DPBS (Gibco, 14190-094) que contenía BSA al 0,5 % (Sigma, A7906)) y se sembraron a 1 x 10⁵ célula/pocillo en 100 µl en placas de 96 pocillos de fondo redondo (VWR, 734-1797). Las células se lavaron una vez en tampón FACS y el mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, simulado FS22-172-003-AA/HeiD1.3, anticuerpo G1-AA/MOR7480.1 y mAb G1-AA/4420 de control negativo se diluyeron (400 nM - 0,005 nM, diluciones de 5 veces) en 100 µl de tampón FACS. 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 tampón FACS. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 anti-IgG humana de cabra, Invitrogen, A21445) diluido 1:1.000 en tampón FACS, la mezcla de células/anticuerpo se incubó durante 20 minutos a 4 °C, y las células se lavaron de nuevo con tampón FACS y se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía 7AAD (1:1.000, Biotium, 40043) antes de analizar usando un citómetro de flujo Canto II (BD Bioscience). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de APC (638 nm 660/20). Los valores de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (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.

Los resultados se muestran en la **Tabla 12**. Se encontró que los mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 y mAb² simulado FS22-172-003-AA/HeiD1.3 se unían a receptores CD137 humanos y de cyno expresados en la superficie celular con valores de CE₅₀ en el intervalo de 4,8 - 9,1 nM, y se encontró que el mAb de control positivo se unía a receptores CD137 humanos y de cyno con un valor de CE₅₀ de 1,45 nM y 4,4 nM respectivamente. No se observó unión a células DO11.10 o HEK293 que no sobreexpresaban CD137, lo que confirma la especificidad de unión por el mAb².

Tabla 12

Antígeno	FS22-172-003-AA/E12v2 (CE ₅₀ (nM))	FS22-172-003-AA/HeID1.3 (CE ₅₀ (nM))	G1-AA/MOR7480.1 (CE ₅₀ (nM))
CD137 humano	6,2 ± 1,95	6,25 ± 2,03	1,48 ± 0,4
CD137 de cynomolgus	7,39 ± 6,07	9,09 ± 6,93	2,6 ± 1,85

9.7 Afinidad de unión de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano por CD137 y PD-L1 expresados endógenamente en células T humanas primarias activadas

- 5 La afinidad del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano por CD137 y PD-L1 expresados endógenamente en células T humanas primarias activadas se determinó usando citometría de flujo. Para aislar las células T, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de conos de depleción de leucocitos, un subproducto de las donaciones de plaquetas. Brevemente, los contenidos de los conos de leucocitos se lavaron abundantemente con PBS y se cubrieron con un gradiente de Ficoll (Sigma-Aldrich, 1440-02). Se aislaron PBMC por centrifugación y se recuperaron las células que no cruzaron el gradiente de Ficoll. Las PBMC se lavaron adicionalmente con PBS y los glóbulos rojos remanentes se lisaron mediante la adición de 10 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos 1X (eBioscience, 00-4300-54) según las instrucciones del fabricante. Se aislaron células T generales de las PBMC presentes en el eluyente usando el kit de aislamiento de células T generales II (Miltenyi Biotec Ltd, 130-095-130) según las instrucciones del fabricante. CD137 se expresa rápidamente a niveles elevados en células T CD8⁺ activadas y también en células T CD4⁺ activadas con niveles más bajos (Xue-Zhong Yu *et al.*, 2013), por lo tanto, las células T generales se estimularon durante 24 horas utilizando perlas de CD3/CD28 activador de T humano Dynabeads™ (Thermo, 11132D) según las instrucciones del fabricante. Las perlas de activador T humano se lavaron de las células T usando un imán DynaMag™-15 (Thermo, 12301D) siguiendo las instrucciones del fabricante antes de usar un ensayo de unión celular para ensayar la unión de mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, mAb² simulado, FS22-172-003-AA/HeID1.3, anticuerpo anti-PD-L1 humano de control positivo G1-AA/E12v2, anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo G1-AA/MOR7480.1, anticuerpo de control negativo G1-AA/4420.

Se prepararon suspensiones de células T humanas generales estimuladas en tampón FACS (DPBS (Gibco, 14190-094) 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 tampón FACS y se diluyeron mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, mAb² simulado FS22-172-003-AA/HeID1.3, anticuerpo de control positivo G1-AA/E12v2, anticuerpo de control positivo G1-AA/20H4.9 y anticuerpo de control negativo G1-AA/4420 (80 nM - 0,005 nM, diluciones de 5 veces) en 100 µl de tampón FACS. Las células lavadas se resuspendieron en la mezcla de anticuerpos diluida que contenía anticuerpo marcado con FITC anti-CD4⁺ humano (BD Biosciences, 550628) y anticuerpo marcado con eFluor450 anti-CD8⁺ humano (Invitrogen, 48-0087-42) para diferenciar entre las células T CD4⁺ y CD8⁺, se incubaron a 4 °C durante 30 minutos y después se lavaron una vez en tampón FACS. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (anticuerpo marcado con Alexa Fluor 647 anti-IgG humana de cabra, Invitrogen, A21445) diluido 1:1.000 en tampón FACS, la mezcla de células/anticuerpo se incubó durante 20 minutos a 4 °C, y las células se lavaron de nuevo con tampón FACS y se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía 7AAD (1:1.000, Biotium, 40043) antes de analizar usando un citómetro de flujo Canto II (BD Bioscience). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de APC (638 nm 660/20) para mostrar la unión del anticuerpo de ensayo. Los valores de media geométrica de la Intensidad de Fluorescencia (GMFI) se representaron 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.

Se encontró que el mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 se unía a células T CD4⁺ y células T CD8⁺ primarias humanas estimuladas como se muestra por los valores de MFI en la **Figura 2**. El anticuerpo de control positivo de PD-L1 G1-AA/E12v2 se unió con valores de MFI similares a los del mAb² a ambas células T CD4⁺ y CD8⁺, confirmando que PD-L1 se expresaba en las células.

Se encontró que G1-AA/MOR7480.1, el control positivo de CD137 se unía a las mismas células descritas anteriormente, aunque el MFI era mucho menor que el observado para FS22-172-003-AA/E12v2 o G1-AA/E12v2. Esto es probablemente debido a que hay un nivel inferior de expresión de CD137 en las células, en comparación con la expresión de PD-L1. Además, el valor de MFI fue mayor para la unión de G1-AA/MOR7480.1 a células T CD8⁺ que en células T CD4⁺. Como se ha descrito anteriormente, se espera observar una menor expresión de CD137 en células T CD4⁺ estimuladas que en células T CD8⁺ (Xue-Zhong Yu *et al.*, 2013) que representa el bajo nivel de unión del anticuerpo de control positivo para CD137 MOR7480.1 en células T CD4⁺ en contraposición a células T CD8⁺. Esta baja expresión de CD137 se observó en células T primarias, particularmente en células T CD4⁺, también probablemente representan la falta o poca unión del Fcab en el formato de mAb² simulado (FS22-172-003-AA/HeID1.3).

9.8 Unión de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano a FcRn mediante SPR

La unión al receptor Fc neonatal (FcRn) es crítica para el reciclaje de anticuerpos (Martins *et al.*, 2016). La unión de mAb² FS22-172-003-AA/lam-G02v3, FS22-172-003-AA/E12v2 y FS22-053-008-AA/E12v2 al FcRn humano y de ratón se midió mediante SPR usando BIAcore T200 (GE Healthcare). Se incluyó G1-AA/HeID1.3 como control de isotipo IgG que carece de mutaciones en el dominio CH3.

Brevemente, los mAb² se recubrieron individualmente en la celda de flujo 2, 3 y 4 del chip sensor CM5 de la serie S (GE Healthcare, BR100530) para lograr una respuesta de aproximadamente 1.000 RU. La celda de flujo 1 se activó/desactivó pero se dejó en blanco como referencia. Se dializó FcRn humano (Acro Biosystems, FCM-H5286) o FcRn de ratón (R&D systems, 9114-Fc) y se diluyó en tampón MHBS-EP+B pH 6,0 o pH 7,4 (MES 10 mM, FortéBio, 18-5026; 1x HBS-EP, GE Healthcare, BR100669; 0,1 mg/ml de BSA, Sigma, A7906) y se inyectó en la celda de flujo 1, 2, 3 y 4 a 2.000-3.000 nM con diluciones de 2 veces durante 1 min a 80 µl/min y luego se dejó disociar en tampón durante 3 min. No se necesitó regeneración. 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 Biacore T200 Evaluation 2.0 para identificar la unión usando el modelo de afinidad en estado estacionario. Los datos de unión se muestran en la **Tabla 13** y demostraron que los mAb² FS22-172-003-AA/lam-G02v3, FS22-172-003-AA/E12v2 y FS22-053-008-AA/E12v2 se unían a FcRn humano o de ratón a pH 6,0 con afinidades similares a las del anticuerpo de control G1-AA/HeID1.3. No se observó unión con FcRn humano o de ratón a pH 7,4. Estos datos mostraron que los mAb² retuvieron la unión a FcRn.

Tabla 13

	K _D para FcRn humano (M)		K _D para FcRn de ratón (M)	
	pH 6,0	pH 7,4	pH 6,0	pH 7,4
FS22-172-003-AA/lam-G02v3	1,22 × 10 ⁻⁶	Sin unión	1,67 × 10 ⁻⁷	Sin unión
FS22-172-003-AA/E12v2	1,12 × 10 ⁻⁶	Sin unión	1,58 × 10 ⁻⁷	Sin unión
FS22-053-008-AA/E12v2	9,98 × 10 ⁻⁷	Sin unión	1,77 × 10 ⁻⁷	Sin unión
G1-AA/HeID1.3	1,23 × 10 ⁻⁶	Sin unión	1,60 × 10 ⁻⁷	Sin unión

9.9 Unión de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano a células que expresan receptores Fcγ por citometría de flujo

Los anticuerpos agonistas dirigidos a miembros de TNFRSF requieren reticulación a través de receptores Fcγ para dirigir la agrupación y activación de la diana para lograr actividad *in vivo* (Li *et al.*, 2013). Sin embargo, con el fin de circunnavegar los posibles efectos fuera de diana tales como la activación sistémica de CD137 debido a la reticulación por la unión al receptor Fcγ y para disminuir la posibilidad de inducir ADCC de células inmunitarias, por ejemplo, células T, que expresan ambas dianas, se decidió disminuir la capacidad de unión al receptor Fcγ del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano mediante introducción de una mutación LALA en el dominio CH2 (véase el **Ejemplo 3.2** para detalles sobre el formato LALA). La unión celular por citometría de flujo a células CHO que sobreexpresaban solo FcγRIIA (ECACC No de Cat: 15042905), FcγRIIA (ECACC No de Cat: 15042903), FcγRIIA (ECACC No de Cat: 15042902), FcγRIIA (ECACC No de Cat: 15042901) o FcγRIIB (ECACC No de Cat: 15042907) se usó para confirmar que la presencia de la mutación LALA en el dominio CH2 del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano había reducido su afinidad de unión por los receptores Fcγ mencionados anteriormente.

Brevemente, se prepararon suspensiones de CHO.FcγRIIA.131H CHO.FcγRIIA.131E CHO.FcγRIIA.158F CHO.FcγRIIA.158V, CHO.FcγRIIB o CHO.WT en tampón FACS (que contenía DPBS (Gibco, 14190-094) que contenía BSA al 0,5 % (Sigma, A7906)) y se sembraron a 1 × 10⁵ célula/pocillo en 100 µl en placas de 96 pocillos de fondo redondo (VWR, 734-1797). Las células se lavaron una vez en tampón FACS y se diluyeron el mAb² FS22-172-003-AA/E12v2, el anticuerpo de control positivo para la unión al receptor Fcγ G1/4420 y el anticuerpo de control negativo para el receptor Fcγ G1-AA/4420 (500 nM-0,03 nM, diluciones de 4 veces) en 100 µl de tampón FACS. 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 tampón FACS. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario (anticuerpo marcado con Alexa Fluor 488 anti-IgG humana de cabra, Stratech Scientific Ltd, 109-545-098-JIR) diluido 1:1.000 en tampón FACS, la mezcla de células/anticuerpo se incubó durante 20 minutos a 4 °C, y las células se lavaron de nuevo con tampón FACS y se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía 7AAD (1:1.000, Biotium, 40043) antes de analizar usando un citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter). Se excluyeron las células muertas y se midió la fluorescencia en el canal de FITC (488 nm 525/40). Los valores de la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (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.

El mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 no mostró unión (o se unió por debajo del nivel del anticuerpo de control negativo G1-AA/4420) a todas las células que expresaban el receptor Fcγ ensayadas (**Figura 3** (A) FcγRIIA 131H, (B) FcγRIIA 131E, (C) FcγRIIB, (D) FcγRIIA 158F, (E) FcγRIIA 158V). Esto indica que la mutación LALA disminuye la unión a FcγRIIA, FcγRIIA o FcγRIIB, lo que también reduciría la reticulación del mAb² a través de estos receptores *in vivo*.

Ejemplo 10: Caracterización de la función de los mAb²

10.1 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en un ensayo de células T CD8⁺ primarias humanas

El ensayo de células T primarias humanas descrito en el **Ejemplo 3.5** se utilizó para ensayar la actividad del mAb².

Para la reticulación basada en células de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano, se produjeron células HEK293 que sobreexpresaban hPD-L1 (HEK.hPD-L1) esencialmente como se describe en el **Ejemplo 3.5**. Las células HEK.hPD-L1 se han modificado por ingeniería para expresar un nivel alto de PD-L1 humano y se usaron junto con células MDA-MB-231 que expresan un nivel medio de PD-L1 humano, así como células SKBR3 que expresan un nivel bajo de PD-L1 humano (**Tabla 14**) tal como se cuantificó mediante perlas de capacidad de unión de anticuerpos (Quantum Simply Cellular, Bans Laboratories, Inc. No. de cat. 816A) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 14

Línea celular	Capacidad de unión a anticuerpos
HEK WT	7.463 (± 971)
HEK.hPD-L1	702.000 (± 58.000)
MDA-MB-231	137.369 (± 2.429)
SKBR3	14.734 (± 239)

Las células T CD8⁺ se aislaron y se activaron usando un anticuerpo anti-CD3 como se describe en el **Ejemplo 3.5**. Se sembraron en placas células HEK.hPD-L1 a 2×10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano recubiertas con anticuerpo anti-CD3 (8 µg/ml) en 100 µl de medio de cultivo de células T (medio RPMI (Life Technologies, 61870-044) con FBS al 10 % (Life Technologies), Penicilina Estreptomicina 1X (Life Technologies, 15140122), Piruvato Sódico 1 mM (Gibco, 11360-070) y 2-mercaptoetanol 50 µM (Gibco, M6250)). Una vez que las células HEK.hPD-L1 o las células HEK que no se transdujeron para expresar hPD-L1 usadas como controles se habían adherido después de 4 horas de incubación, se retiró todo el medio de cultivo de células T y se reemplazó con 100 µl de medio de cultivo de células T que contenía células T a una concentración de $5,0 \times 10^5$ células/ml dando como resultado $5,0 \times 10^4$ células/pocillo.

Para la reticulación basada en células con niveles más bajos que los fisiológicos de expresión de PD-L1, se usó la línea celular de adenocarcinoma de mama humano, MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), con la misma metodología que se describe para la reticulación basada en células HEK.hPD-L1.

Los mAb² se diluyeron en medio de células T a una concentración final 2X comenzando a 50 nM y se llevó a cabo una titulación 1:5. Se añadieron 100 µl de titulación de mAb² a las células para un volumen de ensayo total de 200 µl y concentración 1X de anticuerpo.

El anticuerpo anti-CD137 de control positivo (G1-AA/20H4.9) se diluyó en medio de células T a una concentración final 2X comenzando a 50 nM que contenía agente de reticulación 50 nM (el anticuerpo anti-CH2 humano (mG1/MK1A6)) y se llevó a cabo una titulación 1:5. Se añadieron 100 µl de mezcla diluida de anticuerpo de control positivo/reticulante a las células para un total de 200 µl de volumen de ensayo y concentración 1X de anticuerpo.

El ensayo se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 72 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se ensayaron con el kit de ELISA para IL-2 humana Ready-SET-Go! (eBioscience, Cat. 88-7025-88) 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 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 (Gen5 Software, BioTek). La concentración de IL-2 humana (hIL-2) se representó 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.

La **Tabla 15** muestra los valores de CE_{50} y respuesta máxima de liberación de IL-2 observada en el ensayo de activación de células T en presencia del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano ensayado con reticulación basada en células. El mAb anti-CD137 humano de control positivo, 20H4.9, muestra un aumento en la liberación de hIL-2 con una CE_{50} de 0,21 a 0,31 nM cuando se reticula con anticuerpo anti-hCH2 en cualquier ensayo. Todos los clones tenían actividad en los ensayos, presentando cada uno potencia con CE_{50} subnanomolares. El mAb² FS22-172-003 que contenía Fcab incitó la mayor respuesta de células T con CE_{50} en el intervalo de 0,19 a 0,31 nM en el ensayo basado en HEK.hPD-L1 y 0,01 - 0,02 nM en el ensayo basado en MDA-MB-231. Un subconjunto de los mAb² (que contiene Fcab FS22-053-008, FS22-053-011, FS22-053-014, FS22-173-003 y FS22-172-004) también se ensayó sin reticulación por PD-L1 expresado en células HEK y no mostraron actividad en este ensayo, como se esperaba. La **Figura 4** y **Figura 5** muestra representaciones representativas de la liberación de IL-2 para el ensayo de activación de células T para los mAb² enumerados en la **Tabla 15**.

El linaje de Fcab FS22-053 y FS22-172 también se ensayó en este ensayo usando la línea celular de adenocarcinoma de mama humano que expresa PD-L1 a nivel más bajo, SK-BR-3 (ATCC HTB-30). Como se esperaba, la menor expresión de PD-L1 dio como resultado una menor activación de células T CD8⁺ en línea con los dos ensayos anteriores (datos no mostrados).

Tabla 15

mAb ²	EC ₅₀ (nM) del Donante 171115A		EC ₅₀ (nM) del Donante 171115B	
	HEK.hPD-L1 XL	MDA-MB-231 XL	HEK.hPD-L1 XL	MDA-MB-231 XL
FS22-053-008-AA/E05v2	0,16	0,01	0,11	0,02
FS22-053-008-AA/E12v2	0,10	0,01	0,11	0,02
FS22-053-008-AA/G12v2	0,13	0,02	0,12	0,02
FS22-053-017-AA/E05v2	0,15	0,01	0,12	0,01
FS22-053-017-AA/E 12v2	0,11	0,01	0,12	0,01
FS22-053-017-AA/G12v2	0,10	0,01	0,20	0,01
FS22-172-003-AA/E05v2	0,27	0,02	0,19	0,02
FS22-172-003-AA/E12v2	0,24	0,02	0,31	0,02
FS22-172-003-AA/G12v2	0,21	0,02	0,22	0,01
G1-AA/20H4.9	0,21	0,31	0,29	0,28

Los resultados mostraron que los mAb² podrían unirse a células que expresan diferentes niveles de PD-L1. La unión al PD-L1 expresado en células dio como resultado la reticulación de los mAb² de manera que eran capaces de unirse a, agrupar y activar CD137 en las células T, como se mide por la producción de IL-2. El nivel de activación observado se refiere al nivel de reticulación mediante la unión de PD-L1, en donde el mAb² unido a células que expresan niveles más altos de hPD-L1 (HEK.hPD-L1) hubo una mayor activación, mientras que niveles más bajos de expresión de PD-L1 incitaron menos activación.

10.2 Actividad de un mAb² anti-CD137/PD-L1 humano reticulado con diferentes poblaciones de células HEK.hPD-L1 en un ensayo de activación de células T CD8⁺ primarias humanas

Como se observó que el nivel de expresión de PD-L1 por diferentes líneas celulares afectaba a la activación de CD137, se decidió explorar adicionalmente el impacto de la expresión de PD-L1 sobre la actividad funcional del mAb² ensayado. Se realizó un ensayo similar al descrito en el **Ejemplo 10.1**, donde la relación de células HEK.hPD-L1 a HEK.WT se varió con el fin de modular el nivel de expresión de PD-L1 humano en un enfoque basado en población.

Se sembraron en placas células HEK.hPD-L1 y células HEK que no se transdujeron para expresar hPD-L1 (HEK.WT) en diferentes relaciones para proporcionar el porcentaje de células HEK.hPD-L1 de las células HEK totales presentes enumeradas en la **Figura 6** (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,5 % o 0 %). Se sembraron en placas células HEK a 2×10^5 células HEK totales por pocillo sobre placas de fondo plano de 96 pocillos recubiertas con anticuerpo anti-CD3 (8 $\mu\text{g/ml}$) en 100 μl de medio de cultivo de células T (medio RPMI (Life Technologies, 61870-044) con FBS al 10 % (Life Technologies), 1X Penicilina Estreptomina (Life Technologies, 15140122), Piruvato Sódico 1 mM (Gibco, 11360-070) y 2-mercaptoetanol 50 μM (Gibco, M6250). Una vez que todas las células HEK se habían adherido después de 4 horas de incubación, se retiró todo el medio de cultivo de células T y se reemplazó con 100 μl de medio de cultivo de células T que contenía células T a una concentración de $5,0 \times 10^5$ células/ml dando como resultado $5,0 \times 10^4$ células/pocillo.

El ensayo se realizó con mAb2 anti-CD137/PD-L1 humano FS22-172-003-AA/E12v2, pero aparte de eso se siguió el protocolo descrito en el **Ejemplo 10.1**. El anticuerpo de control positivo anti-CD137 G1-AA/20H4.9 se incluyó con reticulación adicional a través de un anticuerpo anti-CH2. Se usó el anticuerpo G1-AA/4420 como control negativo.

Los resultados en la **Figura 6** muestran que a medida que aumenta la población de células HEK.hPD-L1, también aumentó la actividad del mAb², como se ilustra por un aumento en la concentración máxima de hIL-2 observada. Cuando el 100 % de la población de células HEK presentes fue HEK.hPD-L1, se logró la reticulación máxima y se observó la concentración máxima de hIL-2. El anticuerpo de control positivo G1-AA/20H4.9 también alcanzó una concentración máxima similar de hIL-2 cuando se reticuló artificialmente al máximo por un anticuerpo anti-CH2.

Los datos apoyan la observación de que la cantidad de PD-L1 presente en el sistema (representado ensayando líneas celulares que expresaban diferentes niveles de PD-L1 sobre su superficie celular o modulando el número de células en una población que presenta PD-L1) controla la reticulación del mAb² y de este modo dicta el nivel de agonismo de CD137 inducido por el mAb². Sin embargo, incluso cuando solo están presentes niveles bajos de PD-L1, el mAb² todavía era capaz de agonizar CD137. El mAb² por lo tanto, se espera que tenga actividad cuando PD-L1 se expresa en un sistema, y están presentes células T activadas que expresan CD137. A medida que aumenta el nivel de PD-L1 en el sistema, también se espera que aumente el agonismo ejercido. En contraste con el mAb² que todavía era capaz de inducir agonismo de CD137 en presencia de niveles bajos de CD137, las moléculas CD137/PD-L1 que se unen a CD137 monovalentemente se espera que tengan baja eficacia en presencia de niveles bajos de PD-L1, ya que las moléculas unidas a PD-L1 probablemente estén demasiado separadas para dirigir la agrupación de CD137, que no se espera que sea un problema cuando la molécula puede unirse a CD137 bivalentemente, como es el caso en el mAb² de la invención.

10.3 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos primarios humanos

La actividad del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano se ensayó en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) (véase el **Ejemplo 5.3.4**). El ensayo de MLR usó 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 de puntos de control inmunitario, el ensayo de MLR puede usarse para confirmar que la activación de las células T se potencia por el mAb² en un sistema humano.

Se generaron células T CD4⁺ expandidas e iDC como se describe en el **Ejemplo 5.3.4**.

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 anticuerpos anti-CD137 y anti-PD-L1 y mAb² anti-CD137/PD-L1 humano enumerados en la **Tabla 16** se diluyeron 4x la concentración final por triplicado en 50 μl de medio AIMV en placas de fondo redondo de 96 pocillos (VWR, 734-1797). control negativo se incluyó un anticuerpo anti-glicoproteína gH de citomegalovirus (CMV), designado MSL109 (descrito en WO1994/016730 A1), que contenía la mutación LALA. 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 μl de medio AIM V como 1×10^5 células T CD4⁺ expandidas suspendidas en 100 μl 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 negativos: células T CD4⁺ solas, iDC solas, células T CD4⁺ + iDC y 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 logístico de cuatro parámetros (Gen5 Software, BioTek). La concentración de IFN- γ humano se representó 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.

El anticuerpo anti-PD-L1 humano G1/S70, mostró una potente actividad en el ensayo de MLR con un valor de CE₅₀ de 0,06 nM y un nivel máximo de IFN- γ (E_{máx}) de 1.135 pg/ml (**Tabla 16**, **Figura 7A** y **7B** representativas). La CE₅₀ indica la concentración de mAb a la que se alcanza la mitad de la respuesta agonista, 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 anticuerpo G1-AA/MSL109 de control negativo, como se esperaba. El anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo G1-AA/20H4.9, cuando se reticula con anticuerpo anti-hCH2, no incita ninguna actividad, lo que indica que la expresión de CD137 puede ser baja y que el bloqueo de PD-L1 supera la señalización de CD137 en este ensayo

porque el bloqueo de PD-L1 es muy fuerte. Sorprendentemente, todos los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano ensayados en este ensayo mostraron valores de CE₅₀ muy potentes inferiores a 0,04 nM y valores de E_{máx} altos en el intervalo de 2.626 a 3.327 pg/ml. Esto indica que los mAb² tienen una potencia aumentada en este ensayo por encima de la de cualquiera de los anticuerpos monoclonales de PD-L1 y CD137.

5 **Tabla 16**

Molécula(s)	Tipo	CE50 (nM)	E _{máx} (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E05v2	mAb ²	0,03	2.654
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	0,02	2.626
FS22-053-008-AA/E05v2	mAb ²	0,02	2.797
FS22-053-008-AA/E12v2	mAb ²	0,04	3.128
FS22-053-017-AA/E 12v2	mAb ²	0,04	3.327
G1-AA/20H4,9 + anti-CH2 humano	mAb CD137	N/A	N/A
G1/S70	mAb PD-L1	0,06	1.135
G1-AA/MSL109	Isotipo	N/A	N/A
Células T CD4 ⁺ solas	Control celular	N/A	N/A
iDC solas	Control celular	N/A	N/A
Células T CD4 ⁺ + iDC solas	Control celular	N/A	N/A

N/A - no aplicable ya que la señal baja no permitió la determinación de CE₅₀

10 Siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, se ensayó de nuevo la actividad del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano FS22-172-003-AA/E12v2 en una MLR, pero esta vez frente a cada parte componente (el Fcab anti-FS22-172-003 humano en formato de mAb² simulado y el anticuerpo anti-PD-L1 G1-AA/E12v2), así como la combinación de los dos.

15 El componente de anticuerpo G1-AA/E12v2 anti-PD-L1 humano, mostró una potente actividad en el ensayo de MLR con un valor de CE₅₀ de 0,08 nM y un nivel máximo de IFN-γ (E_{máx}) de 12.421 pg/ml (Tabla 17; Figura 7C representativa). No se observó actividad con el anticuerpo G1-AA/4420 de control negativo, como se esperaba, y no se observó actividad con el Fcab antihumano FS22-173-003 en formato de mAb² simulado. El anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo, G1-AA/20H4.9, cuando se reticuló con anticuerpo anti-hCH2, no incitó ninguna actividad, lo que indica que la expresión de CD137 puede ser baja y que el bloqueo de PD-L1 supera la señalización de CD137 en este ensayo porque el bloqueo de PD-L1 es muy fuerte como se observó anteriormente. Como se esperaba, el mAb² anti-CD137/PD-L1 humano FS22-172-003-AA/E12v2 mostró un valor de CE₅₀ muy potente de 0,07 nM y un valor de E_{máx} alto de 17.874 pg/ml. Esto indica que el mAb² tiene una potencia aumentada en este ensayo por encima de la de los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y anti-CD137 solos o ambos en combinación. Los datos también muestran que el mAb² tuvo mayor potencia que la combinación de dos anticuerpos que comprenden los sitios de unión Fcab y Fab del mAb², respectivamente.

Tabla 17

Molécula(s)	Tipo	CE ₅₀ (nM)	Emáx (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	0,07	17.874
FS22-172-003-AA/HeID1.3	mAb ²	N/A	3.574
G1-AA/E12v2	mAb PD-L1	0,08	12.421
FS22-172-003-AA/HeID1.3 + G1-AA/E12v2	Combinación de componentes	0,06	12.301
G1-AA/20H4,9 + anti-CH2 humano	mAb CD137	1,9	4.307
G1-AA/E12v2 + G1-AA/20H4.9 + anti-CH2 humano	Combinación de mAb	0,14	17.525
G1-AA/4420	Isotipo	N/A	N/A
Células T CD4 ⁺ solas	Control celular	N/A	N/A
iDC solas	Control celular	N/A	N/A
Células T CD4 ⁺ + iDC solas	Control celular	N/A	N/A

N/A - no aplicable ya que la señal baja no permitió la determinación de la CE₅₀

10.4 Actividad de mAb² anti- CD137/PD-L1 humano en un ensayo de activación de células T de recuerdo con antígeno

5 La actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano se ensayó en un ensayo de activación de células T de recuerdo con antígeno midiendo la respuesta inmunitaria a dos conjuntos de péptidos distintos que contenían antígenos fisiológicamente relevantes. Un conjunto comprendía péptidos restringidos por MHC de clase I de citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus de la gripe (CEF) que ensayan la activación de células T CD8⁺ y el segundo conjunto comprendían péptidos restringidos por MHC de clase II de citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de la gripe y toxina tetánica (CEFT), que ensayaron la activación de células T CD4⁺. Como se usaron PBMC humanas de un único donante, y como las células inmunitarias contenían niveles fisiológicos de reguladores de puntos de control inmunitario y se estimularon por presentación de antígeno en lugar de reticulación del receptor de células T por anticuerpo anti-CD3, los resultados del ensayo confirman que la activación de las células T dirigida por antígeno se potencia por el mAb² en un sistema humano.

15 Se descongelaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) crioconservadas y se contaron y se sembraron 1,9 x 10⁵ células por pocillo en una placa de fondo plano de 96 pocillos en 200 µl de medio del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) de que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10 % + 1 ng/ml de IL-2 + 5 ng/ml de IL-7 y bien 1 µg/ml de una combinación de péptidos CEF (Thinkpeptides, no. de cat. PX-CEF-G) o 1 µg/ml de una combinación de péptidos CEFT (Thinkpeptides, no. de cat. PX-CEFT-G). Las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 3 días. Después de 3 días, el medio se reabasteció mediante la adición de 22,5 µl de RPMI fresco que contenía FBS al 10 % y manteniendo 1 ng/ml de IL-2 y 1 ng/ml de IL-7. Las células se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 4 días más.

20 Las células se recogieron y combinaron juntas y después se distribuyeron a través de placas de fondo redondo de 96 pocillos a 1 x 10⁵ células por pocillo en 150 µl de RPMI que contenía FBS al 10% + 1 ng/ml de IL-2 + 5 ng/ml de IL-7 y bien 1 µg/ml de una combinación de péptidos CEF o 1 µg/ml de una combinación de péptidos CEFT. Los mAb² se diluyeron en el mismo medio en el que se sembraron las células y se añadieron a las células.

25 Cada uno del anticuerpo anti-CD137 de control positivo (G1-AA/20H4.9) y el anticuerpo anti-PD-L1 de control positivo (G1-AA/E12v2) se diluyeron en el mismo medio en el que se sembraron las células, a una concentración final 2X comenzando a 400 nM que contenía agente de reticulación 400 nM (el anticuerpo anti-CH2 humano (MK1A6)) y se llevó a cabo una titulación 1:5. Se añadieron 50 µl de mezcla diluida de anticuerpo de control positivo/reticulante a las células para un total de 200 µl de volumen de ensayo y 1X de concentración de anticuerpo.

30 El ensayo se incubó a 37 °C, CO₂ al 5% durante 72 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se ensayaron con un kit MSD U-PLEX (Meso Scale Discovery, no. de cat. K15067L-2) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un instrumento lector de placas de electroquimioluminiscencia MESO QuickPlex SQ 120 usando una dilución de muestra de 1:5. Se calculó una curva patrón para el cálculo de la concentración de citocinas usando el software MSD Discovery Workbench 4.0 y se ajustó la concentración de citocinas en el sobrenadante usando la

ecuación de logaritmo (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism.

Como se muestra en la **Tabla 18** y la **Tabla 19**, el anticuerpo anti-PD-L1 humano G1-AA/E12v2, mostró actividad para la activación de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ con un valor de CE₅₀ de 0,06 nM y 0,04 nM respectivamente (E_{máx} de 65.840 pg/ml y 86.613 pg/ml respectivamente). La CE₅₀ indica la concentración de mAb a la que se alcanza la mitad de la respuesta agonista, mientras que E_{máx} es un valor absoluto que indica la concentración máxima de IFN-γ conseguida en el ensayo. El anticuerpo anti-CD137 humano de control positivo G1-AA/20H4.9, cuando se reticuló con anticuerpo anti-hCH2, mostró actividad para la activación de células T CD8⁺, con un valor de CE₅₀ de 0,33 nM y un valor de E_{máx} de 116.204 pg/ml, pero no incitó ninguna actividad para la activación de células T CD4⁺, lo que indica que la expresión de CD137 puede ser mayor en células T CD8⁺ en comparación con células T CD4⁺. No se observó actividad con el anticuerpo G1-AA/4420 de control negativo, como se esperaba. Sorprendentemente, el mAb² mostró activación en los ensayos tanto de activación de células T CD4⁺ como de activación de células T CD8⁺ con valores de CE₅₀ de 0,08 nM y 0,03 nM respectivamente. El mAb² pudo unirse a PD-L1 expresado en PBMC y tuvo actividad de PD-L1 equivalente en ambos tipos de células. Además, la unión a PD-L1 expresado en PBMC dio como resultado la reticulación de los mAb² de manera que fueron capaces de unirse a, agrupar y activar CD137 en ambos subtipos de células T, como se mide por la liberación de IFN-γ. La concentración máxima de IFN-γ liberada por las células T tratadas con mAb² fue mayor que la de cualquiera de los anticuerpos de control positivo con valores de E_{máx} de 86.680 pg/ml y 188.242 pg/ml para la activación de células T CD4⁺ y la activación de células T CD8⁺ respectivamente. Esto indica el mAb² tiene actividad aumentada en este ensayo por encima de la de cualquiera de los anticuerpos monoclonales de PD-L1 y CD137.

Tabla 18 - Valores del ensayo de recuerdo con antígeno de combinado de péptidos CEFT (Activación de células T CD4⁺)

Molécula(s)	Tipo	CE ₅₀ (nM)	E _{máx} (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	0,08	86.680
G1-AA/20H4.9 + anti-CH2 humano	mAb CD137	N/A	12.965
G1-AA/E12v2	mAb PD-L1	0,06	65.840
G1-AA/4420	Isotipo	N/A	N/A

N/A - no aplicable ya que la señal baja no permitió la determinación de CE₅₀

Tabla 19 - Valores del ensayo de recuerdo con antígeno de combinado de péptidos CEF (Activación de células T CD8⁺)

Molécula(s)	Tipo	CE ₅₀ (nM)	E _{máx} (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	0,03	188.242
G1-AA/20H4.9 + anti-CH2 humano	mAb CD137	0,33	116.204
G1-AA/E12v2	mAb PD-L1	0,04	86.613
G1-AA/4420	Isotipo	N/A	N/A

N/A - no aplicable ya que la señal baja no permitió la determinación de CE₅₀

10.5 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en un ensayo de activación de células T DO11.10 de ratón con bloqueo de PD-L1

La actividad de FS22-172-003-AA/E12v2 se ensayó en un ensayo de activación de células T DO11.10 de ratón para investigar la actividad de bloqueo del punto de control de PD-L1. La actividad funcional hacia PD-L1 humano se examinó en un ensayo de liberación de IL-2 usando células T de OVA DO11.10 y células de hibridoma de células B LK35.2 como se describe en el **Ejemplo 5.4**.

Los resultados se muestran en la **Tabla 20**. El mAb² anti-CD137/PD-L1 humano mostró una actividad potente en el ensayo de activación de células T DO11.10 de ratón con un valor de CE₅₀ de 1,27 nM, lo que confirma que FS22-172-003-AA/E12v2 puede unirse a PD-L1 y bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1. Su actividad fue similar a la de los anticuerpos anti-PD-L1 humano de control positivo G1-AA/E12v2 y G1-AA/S70, lo que indica que no se produjo pérdida de actividad anti-PD-L1 humano cuando se incorporó G1-AA/E12v2 en la molécula de mAb² FS22-172-003-AA/E12v2.

Tabla 20 - Valores del ensayo de activación de células T DO11.10 (liberación de IL-2 de ratón)

Molécula(s)	Tipo	CE ₅₀ (nM)	E _{máx} (pg/ml)
FS22-172-003-AA/E12v2	mAb ²	1,27	424
G1-AA/E12v2	mAb PD-L1	1,19	480
G1-AA/S70	mAb PD-L1	1,4	498
G1-AA/HeID1.3	mAb de control de isotipo de IgG1 humana	N/A	N/A

N/A - no aplicable ya que la señal baja no permitió la determinación de CE₅₀

Ejemplo 11: Reactividad cruzada funcional de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en ensayos funcionales de cynomolgus

11.1 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en un ensayo de activación de células T DO11.10 de cynomolgus

La agrupación de CD137 a través de moléculas agonistas en células T activadas incita la activación de las células T y la señalización aguas abajo que da como resultado, pero no se limita a, la producción de IL-2. La capacidad del mAb² anti-CD137/PD-L1 humano para activar las células DO11.10 que expresan CD137 de cynomolgus se ensayó en un ensayo de activación de células T. Se desarrolló un ensayo de activación de células T DO11.10 usando células T DO11.10 modificadas por ingeniería para sobreexpresar CD137 de cynomolgus y se evaluó la activación de las células T midiendo la liberación de IL-2.

Se produjeron células DO11.10 (National Jewish Health) que expresaban CD137 de cynomolgus de longitud completa (SEQ ID NO: 189) designadas 'DO11.10.cCD137' y se confirmó la expresión de CD137 de cynomolgus como se describe en el **Ejemplo 1.2**.

Se ensayaron los siguientes mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en este ensayo de activación de células T DO11.10: FS22-172-003-AA/lamG02v3, FS22-053-008-AA/E05v2, FS22-053-008-AA/E12v2, FS22-053-008-AA/G12v2, FS22-053-017-AA/E05v2, FS22-053-017-AA/E12v2, FS22-053-017-AA/G12v2, FS22-172-003-AA/E05v2, FS22-172-003-AA/E12v2, FS22-172-003-AA/G12v2. Se prepararon diluciones de mAb² o mAb de control positivo G1-AA/MOR7480.1 con o sin anticuerpo anti-hCH2 (mG1/MK1A6) reticulante y se añadieron a células DO11.10.cCD137 en una placa de fondo redondo de 96 pocillos que se había recubierto durante la noche con 0,1 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (clon 17A2, BioLegend, 100208) y se habían sembrado con 2x10⁵ células HEK.cyPD-L1 que se van a usar como células de reticulación basadas en células, que sobreexpresaban PD-L1 de cynomolgus. Se prepararon células que sobreexpresaban PD-L1 de cynomolgus como se describe en el **Ejemplo 5.3.3**, usando el PD-L1 de cynomolgus como se describe en el **Ejemplo 9.5**. Después de una incubación de 18 horas, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo con el kit de ELISA para IL-2 de ratón (eBioscience, 88-7024-86) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron a 450 nm usando el lector de placas con el software Gens, 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 logístico de cuatro parámetros (Gens Software, BioTek). La concentración de mIL-2 se representó frente al logaritmo de la concentración de mAb² o mAb de referencia y las curvas resultantes se ajustaron usando la ecuación log (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism.

Todos los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano ensayados en este ensayo mostraron actividad en presencia de células HEK que sobreexpresan PD-L1 de cynomolgus para reticular el mAb² indicando que todos los mAb² son capaces de unirse tanto a PD-L1 de cynomolgus como de unirse y de agrupar CD137 de cynomolgus incitando la activación de células T DO11.10 como lectura de la producción de IL-2 (véase la **Tabla 21** y la **Figura 8**). Todos los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano mostraron una actividad similar con valores de CE₅₀ en el intervalo de 0,06 a 0,11 nM y valores de E_{máx} en el intervalo de 8.060 a 12.300 pg/ml de IL-2 sólo cuando se reticularon mediante PD-L1 de cynomolgus expresado en células. En ausencia de PD-L1 de cynomolgus, cuando el ensayo se llevó a cabo usando células HEK que no expresan PD-L1 de cynomolgus, no hubo actividad como resultado de ninguna reticulación. El anticuerpo G1-AA/MOR7480.1 de CD137 de control positivo que se ha mostrado que presenta reactividad cruzada con cynomolgus (Fisher *et al*, 2012) muestra actividad en este ensayo, cuando se reticula con anti-CH2, sin embargo, todos los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano son mejores tanto en términos de valores más bajos de CE₅₀ como de valores más altos de E_{máx} lo que indica reactividad cruzada y mejor actividad en un sistema que expresa CD137 de cynomolgus.

Tabla 21

Molécula	Tipo	CE ₅₀ (nM) (reticulado)	E _{máx} (pg/ml) (reticulado)
FS22-172-003-AA-lam/GO2v3	mAb ²	0,08	12.304
FS22-053-008-AA/E05V2	mAb ²	0,06	8.057
FS22-053-008-AA/E12V2	mAb ²	0,08	9.010
FS22-053-008-AA/G12V2	mAb ²	0,07	9.656
FS22-053-017-AA/E05V2	mAb ²	0,10	9.021
FS22-053-017-AA/E12V2	mAb ²	0,11	9.362
FS22-053-017-AA/G12V2	mAb ²	0,08	8.933
FS22-172-003-AA/E05V2	mAb ²	0,08	10.520
FS22-172-003-AA/E12V2	mAb ²	0,06	11.291
FS22-172-003-AA/G12V2	mAb ²	0,06	11.216
G1-AA/MOR7480.1	mAb CD137	0,71	5.705

11.2 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en un ensayo de reacción de leucocitos mixtos primarios de cynomolgus

- 5 La actividad de los mAb² anti-CD137/PD-L1 humano se ensayó en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos de cynomolgus (MLR). De manera similar al ensayo de MLR humano descrito en el **Ejemplo 10.3** este ensayo mide una respuesta de inmunoensayo celular que se produce entre dos poblaciones de linfocitos alogénicos (de la misma especie, pero genéticamente distinta). El ensayo usa células T CD4⁺ de un individuo de cynomolgus y monocitos CD14⁺ de otro individuo. Como las células inmunitarias contienen niveles fisiológicos de reguladores de puntos de control
- 10 control inmunitario, el ensayo de MLR puede usarse para confirmar que la activación de las células T se potencia por el mAb² en un sistema de cynomolgus.

Aislamiento de células T CD4⁺

- 15 Se aislaron PBMC de muestras de sangre de monos cynomolgus mediante separación en gradiente de Ficoll. Se aislaron células T CD4⁺ usando un kit de aislamiento de CD4⁺ de primate no humano (Miltenyi Biotec Ltd, 130-091-102) según las instrucciones del fabricante. Se usaron células frescas en el ensayo MLR.

Aislamiento de monocitos CD14⁺

Se aislaron monocitos no tratados a partir de PBMC de cynomolgus usando un kit de aislamiento de CD14 de primate no humano, (Miltenyi Biotec Ltd, 130-091-097) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron monocitos frescos en el ensayo de MLR.

20 Ensayo MLR

- 25 Se diluyeron el mAb² anti-CD137/PD-L1 humano FS22-172-003-AA/E12v2 y el anticuerpo anti-PD-L1 humano G1-AA/E12v2 y el anticuerpo de control de isotipo G1-AA/4420 4x la concentración final por triplicado en 50 µl de medio AIM V en placas de fondo redondo de 96 pocillos (VWR, 734-1797). Se incluyó como control negativo un anticuerpo anti lisozima de huevo de gallina (HEL), designado HelD1.3 (descrito en el **Ejemplo 2.2**), que contenía la mutación LALA. Se ensayó una serie de diluciones de 4 veces partiendo de 300 nM a 0,02 nM. Se añadieron tanto 7,5x10⁴ células monocíticas suspendidas en 50 µl de medio AIM V como 7,5x10⁵ células T CD4⁺ suspendidas en 100 µl de medio AIM V a las diluciones de anticuerpo y se incubaron durante 6 días a 37 °C + CO₂ al 5 %. Se incluyeron los siguientes controles negativos: células T CD4⁺ solas, monocitos CD14⁺ solos, células T CD4⁺ + iDC y medio AIM V solo. Los sobrenadantes se recogieron el día 2 y se midieron las concentraciones de interleucina 2 (IL-2) usando un

panel de perlas magnéticas con citocinas de primates no humanos MILLIPLEX MAP (Merck Millipore, no. de cat. PRCTOMAG-40K-01), los sobrenadantes también se recogieron el día 6 y se midieron las concentraciones de interferón gamma (IFN- γ) usando el mismo kit. Las muestras se analizaron en máquinas Bio Plex 200, de Bio-Rad.

Ambos mAb² anti-CD137/PD-L1 humano mostraron actividad en este ensayo indicando que los mAb² son capaces de unirse a PD-L1 de cynomolgus y posteriormente unirse y agrupar CD137 de cynomolgus a niveles de expresión endógenos a células inmunitarias de cynomolgus recién aisladas, dando como resultado la liberación de citocinas como resultado de la activación de las células T (véase la **Figura 9**).

11.3 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en un ensayo de PBMC primarias de cynomolgus

La actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano se ensayó en un ensayo de PBMC primarias de cynomolgus. Este ensayo mide una respuesta de inmunoensayo celular que se produce en una población mixta de PBMC que se han estimulado con mAb anti-CD3. El ensayo usa PBMC completas de un individuo de cynomolgus y, como las células inmunitarias contienen niveles fisiológicos de reguladores de puntos de control inmunitario, el ensayo de PBMC puede usarse para confirmar que la activación de las células T está potenciada por el mAb² en un sistema cynomolgus.

El experimento se realizó esencialmente como se describe en el **Ejemplo 3.5** con las siguientes desviaciones: el anticuerpo anti-CD137 de control positivo (G1-AA/MOR7480.1) se diluyó en el mismo medio en el que se sembraron las células, a una concentración final 2X comenzando a 40 nM que contenía agente de reticulación 40 nM (el anticuerpo anti-CH2 humano (MK1A6) y se llevó a cabo una titulación 1:4. El mAb² (FS22-172-003-AA/E12v2) y el anticuerpo de control negativo (G1-AA/HeID1.3) se diluyeron de la misma manera sin el agente de reticulación. Se añadieron 100 μ l de mezcla diluida de anticuerpo/reticulante a las células para un total de 200 μ l de volumen de ensayo y 1X concentración de anticuerpo. El ensayo se incubó a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 3 días. Los sobrenadantes se recogieron y se ensayaron con un kit de Panel Proinflamatorio 1 MSD V-Plex (NHP) (Meso Scale Discovery, no. de cat. K15056D-2) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un instrumento lector de placas de electroquimioluminiscencia MESO QuickPlex SQ 120. Se calculó una curva patrón para el cálculo de la concentración de citocinas usando el software MSD Discovery Workbench 4.0 y se ajustó la concentración de citocinas en el sobrenadante usando la ecuación de logaritmo (agonista) frente a respuesta en GraphPad Prism.

La **Figura 28A** muestra un gráfico representativo de la liberación de IFN- γ de la activación de las células T en el ensayo de PBMC de cynomolgus y la **Figura 28B** muestra un gráfico representativo de la liberación de IFN- γ de la activación de células T en el ensayo de PBMC humanas.

El anticuerpo anti-CD137 humano G1-AA/MOR7480.1 cuando se reticuló con anticuerpo anti-hCH2, mostró actividad en ambos ensayos de PBMC. No se observó actividad con el anticuerpo de control negativo G1-AA/HeID1.3, como se esperaba. Sorprendentemente, los mAb² mostraron una activación similar en ambos ensayos de PBMC con valores de CE₅₀ de 0,08 nM y 0,03 nM respectivamente. La CE₅₀ indica la concentración de mAb a la que se alcanza la mitad de la respuesta agonista. Por lo tanto, el mAb² pudo unirse al PD-L1 expresado en PBMC, lo que dio como resultado la reticulación de los mAb² de manera que fueron capaces de unirse a, agrupar y activar CD137 en las células T de ambas especies, como se mide por liberación de IFN- γ . La concentración máxima de IFN- γ liberada por las células T tratadas con mAb² fue mayor que cualquiera de los anticuerpos de control positivo, lo que indica que el mAb² tiene actividad aumentada en este ensayo por encima de la de los anticuerpos monoclonales anti-CD137.

Ejemplo 12: Producción de un Fcab anti-CD137 de ratón

Para ensayar la actividad de mAb² que contenían una región de unión a antígeno CD137 en modelos de ratón *in vivo*, debido al riesgo de no ser capaces de obtener Fcab de ratón con reactividad cruzada en seres humanos debido a la baja homología de secuencia entre las secuencias de CD137 de ratón y humana, se generaron y caracterizaron Fcab que se unían específicamente a CD137 de ratón. Después de generar los Fcab de unión a CD137 de ratón, sorprendentemente, se encontró posteriormente que FS22-053-14 era capaz de presentar reactividad cruzada con ratón y ser humano.

12.1 Selección sin tratamiento previo de Fcab anti-CD137 de ratón

Con el fin de seleccionar los Fcab que se unen a CD137 humano, se emplearon campañas de selección de presentación en levaduras y fagos, similares a las descritas previamente para la selección de Fcab que se unen a CD137 humano (véase el **Ejemplo 2.1**). Se usaron como antígenos, CD137 dimérico de ratón recombinante o células que expresaban CD137 de ratón de longitud completa (véase el **Ejemplo 1**).

Se usaron el antígeno mCD137-mFc-Avi interno y las células DO11.10 que expresaban mCD137 (DO11.10.mCD137) en selecciones usando las seis bibliotecas de fagos. Todas las producciones de antígeno recombinante de la ronda 3 (576 clones) y las producciones de selección de células de la ronda 3 (576 clones) se cribaron mediante ELISA de fagos y para determinar la unión celular a células DO11.10.mCD137. Se subclonaron 34 coincidencias de clon de Fcab y se produjeron como mAb² HeID1.3 como se describe en el **Ejemplo 2.2**.

Las cuatro bibliotecas de levadura sin tratamiento previo que presentaban dominios CH1 a CH3 de IgG1 humana usadas previamente para la selección de Fcab que se unían a CD137 humano se usaron para selecciones de Fcab que se unen a CD137 de ratón. Se realizaron un total de 53 rondas separadas de selecciones para identificar los ligantes anti-CD137 de ratón. Se usó antígeno CD137 de ratón biotinilado, dimérico, producido internamente (mCD137-mFc-Avi) para seleccionar ligantes de las bibliotecas de levadura sin tratamiento previo.

12.2 Caracterización de Fcab anti-CD137 de ratón a partir de selecciones sin tratamiento previo

La especificidad de los Fcab anti-CD137 de ratón para CD137 de ratón se ensayó en formato de mAb² "simulado" HeID1.3 y se midió por BLI en un sistema Octet QKe ensayando la unión de los Fcab a otros receptores TNFRSF de ratón (CD40, OX40, GITR). Biosensores de estreptavidina (PALL ForteBio 18-5021) para recubrir receptores CD40, GITR, OX40 de ratón 10 ng/μl (todos obtenidos de R&D Systems y biotinilados usando un kit EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotina de ThermoScientific #21328). Los Fcab anti-CD137 de ratón en formato de mAb² simulado se diluyeron 1:1 en tampón cinético (PALL 18-1092) hasta una concentración final de al menos 1 μM. Los sensores recubiertos con antígeno se sumergieron en las soluciones de mAb² durante 180 segundos seguido de 180 segundos en 1x tampón cinético. Se usaron anticuerpos para cada uno de los receptores de TNFRSF como controles positivos. Los clones de Fcab FS22m-055, FS22m-063, FS22m-066, FS22m-075, FS22m-135, FS22m-055, FS22m-063, FS22m-066 no se unieron a ninguno de los receptores de TNFRSF ensayados, demostrando así su especificidad por CD137 de ratón.

Se produjeron células HEK.FRT.luc que expresaban la secuencia de CD137 de ratón (SEQ ID NO: 187) siguiendo la misma metodología que se ha descrito previamente en el **Ejemplo 2.3**. Los mAb² que contenían los Fcab anti-CD137 de ratón previamente seleccionados se cribaron usando esta línea celular, HEK.FRT.luc.mCD137 según el método descrito en el **Ejemplo 2.3**. Se ensayaron 56 mAb² de los cuales 29 fueron positivos para la actividad de NF-κB. Se usó Lob12.3 que contenía un Fc de IgG1 humana con una mutación LALA (G1-AA/Lob12.3), como control positivo de mAb anti-CD137 de ratón y mostró un aumento en la luminiscencia confirmando la validez del ensayo. Se usó HeID1.3, que también contenía un Fc de IgG1 humana con una mutación LALA, como control negativo de isotipo de IgG humana para descartar la interferencia del Fab simulado de IgG humana en este ensayo. Se calcularon las CE₅₀ cuando fue posible y los mAb² que no alcanzaron una meseta en la actividad, se ignoraron a favor de los mAb² que mostraron una cinética de actividad sigmoidea clásica. Los mAb² se clasificaron en orden de CE₅₀ y veces de cambio en la actividad tras la reticulación de la Proteína L. Se seleccionó FS22m-063 basándose en que tenía la mejor CE₅₀ tras la reticulación (1,44 nM) y las veces de cambio más alta en la actividad tras la reticulación (27 veces).

12.3 Actividad de los Fcab FS22m-063, FS22-053-014 y FS22-053-017 en formato de mAb² simulado en el ensayo de activación de células T DO11.10 de CD137 de ratón

El clon FS22-053-017 (en formato de mAb² simulado HeID1.3) también se comparó frente al clon de Fcab de unión a CD137 murino FS22m-063 (también en formato de mAb² simulado HeID1.3), así como el clon parental FS22-053-014 (en formato de mAb² simulado HeID1.3), en un ensayo de activación de células T DO11.10 de CD137 de ratón como se describe en el **Ejemplo 2.4**. Las moléculas de mAb² se reticularon con Proteína L a una relación molar 4:1 (mAb²: Proteína L). Los resultados se muestran en la **Tabla 22**.

Como se esperaba, todas las moléculas ensayadas mostraron actividad medida por la liberación de IL-2 cuando se reticularon con Proteína L, pero no tuvieron actividad cuando no se reticularon. El FS22m-063 que se seleccionó para unirse a CD137 de ratón tenía la mejor actividad en el ensayo, con una CE₅₀ de 0,39 nM cuando está reticulado. Tanto FS22-053-14 como FS22-053-017 tuvieron actividad en el ensayo, indicando que la función no se perdió debido a mutagénesis, aunque FS22-053-017 tuvo una ligera pérdida de actividad con una CE₅₀ que era aproximadamente 8 veces peor que FS22-053-14 cuando se reticulaba por la Proteína L. La **Figura 10** muestra que los Fcab de CD137 de afinidad madurada con reactividad cruzada humana y murina FS22-053-014 y FS22-053-017, y el Fcab de anti-CD137 de ratón FS22m-063, en formato de mAb² simulado HeID1.3 activaba CD137 cuando se reticulaba con Proteína L conduciendo a una liberación de mIL-2 en un ensayo de activación de células T DO11.10.

Tabla 22

Clon de Fcab (en formato de mAb ² HeID1.3) o mAb	Liberación de IL-2 con o sin reticulación de Proteína L		
	Sin XL	+XL E _{máx} (IL-2 pg/ml)	+XL CE ₅₀ (nM)
FS22-053-014	N/A	28.071	2,04
FS22-053-017	N/A	41.042	16,74
FS22m-063	N/A	24.175	0,39

Clon de Fcab (en formato de mAb ² HeID1.3) o mAb	Liberación de IL-2 con o sin reticulación de Proteína L		
	Sin XL	+XL E _{máx} (IL-2 pg/ml)	+XL CE ₅₀ (nM)
G1-AA/Lob12.3 + Proteína L	N/A	21.332	2,26

N/A - no aplicable ya que la señal baja no permitió la determinación de CE₅₀

Ejemplo 13: Caracterización *in vitro* de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón

Para ensayar la actividad de mAb² que contenían una región de unión a antígeno CD137 en modelos de ratón *in vivo*, se eligió FS22m-063 como el Fcab que mostraba la mejor actividad en el ensayo de activación de células T como se describe en el **Ejemplo 12.3**.

13.1 Construcción, expresión y purificación de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón

Se produjeron mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón que comprendían el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 y también una región Fab de unión a PD-L1 (clon YW243.55.S70 de US 8.217.149 B2). Se prepararon de manera similar al método descrito en el **Ejemplo 3.2** mediante sustitución de parte del CH3 del anticuerpo de unión anti-PD-L1 que contenía los bucles AB, CD y EF con la región correspondiente del Fcab. Estos mAb² modelo PD-L1 comprendían una mutación LALA en el dominio CH2 (AA). Se sabe que la introducción de la mutación LALA en el dominio CH2 de la IgG1 humana reduce la unión al receptor Fcγ (Bruhns, P., *et al.* (2009) y Hezareh M., *et al.* (2001)).

Se produjeron mAb² FS22m-063-AA/PD-L1 mediante expresión transitoria en células HEK293-6E y se purificaron usando columnas de Proteína A mAb Select SuRe.

13.2 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en un ensayo de activación de células T OT-1 primarias de ratón

Para ensayar la actividad del mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en células que no se han modificado por ingeniería para sobreexpresar CD137, se necesitó un ensayo de células T primarias de ratón. Las células T CD8⁺ citotóxicas activadas son responsables de matar directamente las células cancerosas y expresan CD137 en su superficie celular (Ye *et al.*, 2014). Se sabe que la agrupación de CD137 es esencial para inducir la señalización aguas abajo y la activación adicional de las células T CD8⁺. Por lo tanto, se usó un ensayo de activación de células T CD8⁺ para evaluar la capacidad de los mAb² para dirigir la agrupación y la posterior señalización aguas abajo de CD137. Aunque se hicieron intentos para reflejar el ensayo de activación de células T CD8⁺ humanas de manera idéntica, las células T CD8⁺ murinas aisladas de bazo de C57BL/6 o Balb/c sin tratamiento previo no mostraron el potencial de activación requerido para dicho ensayo. Por lo tanto, se desarrolló un ensayo de activación de células T CD8⁺ específico de antígeno alternativo. La activación de las células T CD8⁺ se logró mediante estimulación antigénica de células T OT-1 modificadas genéticamente, aisladas de ratones C57BL/6 OT-1 (Jackson Laboratory, No. de cat. 003831) que tenían un receptor de células T específico para el péptido 257-264 de ovalbúmina, y se determinó mediante la liberación de IL-2.

Para aislar células T CD8⁺, se aislaron esplenocitos de bazo de ratón OT-1 frescos. Brevemente, se recogió cada bazo de un ratón C57BL/6 OT-1 y se almacenó en PBS antes de transferirse a un pocillo de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos y se disrumpió mecánicamente con 2 agujas. El bazo disrumpido se pasó a través de un filtro celular de 70 µm y el filtro se aclaró con PBS. La suspensión celular se sedimentó después por centrifugación, el sobrenadante se eliminó, y los glóbulos rojos se lisaron mediante la adición de 10 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos 1X (eBioscience, 00-4300-54) según las instrucciones del fabricante. Los esplenocitos se sembraron en placas para medio de activación de células T (IMDM, FCS al 5 %, 2-mercapto etanol 50 µM, Penestrp 1X) que contenía péptido SIINFEKL 10 nM (SEQ ID NO: 194) InvivoGen, no. de cat. vac-sin) en placas de 6 pocillos a 1x10⁶ células por pocillo. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C con CO2 al 5 %. Después de 48 horas las células T CD8⁺ se aislaron usando un Kit de aislamiento de células T CD8⁺ (Miltenyi Biotec, 130-104-075) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células T CD8⁺ aisladas y activadas se sembraron en placas en medio (IMDM, FCS al 5 %, 2-mercapto etanol 50 µM, 1X Penestrp) suplementado con 30 U/ml de IL-2 (Peprotech, AF-200-02) y se mantuvieron a menos de 1x10⁶ por ml en cada división diaria durante 3 días más. Después de los tres días de expansión, las células se usaron entonces en el siguiente ensayo.

La incubación con células B16.F10, que se cultivaron en presencia de IFN-γ para inducir la expresión de PD-L1, y que después se pulsaron con péptido SIINFEKL se usó como primera señal para dirigir la activación inicial de las células T OT-1 y posteriormente se usaron para evaluar la eficacia del mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70.

Brevemente, las células B16.F10 se cultivaron primero en presencia de 20 ng/ml de IFN-γ murino (Peprotech, no. de cat. AF-315-05-100UG) para inducir la expresión de PD-L1. Estas células se incubaron después con péptido SIINFEKL 500 nM durante una hora a 37 °C antes de sembrarse a 1,5 x 10⁴ células por pocillo en 100 µl de medio en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron 2 x 10⁴ células OT-1 por pocillo a las células B16.F10 en 50 µl de medio. Los anticuerpos de ensayo (FS22m-063-AA/S70, G1-AA/S70, G1-AA/Lob12.3, FS22m-063-AA/HeID1.3) se

prepararon en una titulación 1:4 comenzando a 160 nM (concentración final 4X) y se añadieron 50 µl de mezcla de anticuerpos a cada pocillo, dando como resultado, por consiguiente, un volumen de ensayo final de 200 µl. El ensayo se incubó durante 3 días a 37 °C con CO₂ al 5 %. Después de 3 días, se recogieron los sobrenadantes y se realizó un ELISA para mIFN-γ (eBioscience, no. de cat. 88-7314-88) según las instrucciones del fabricante.

- 5 Como se ve en la **Figura 11** y en la **Tabla 23**, el mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón tiene la mayor potencia con un valor de CE₅₀ de 0,003 nM. Este ensayo indica que el mAb² tiene una fuerte potencia como resultado del agrupamiento de CD137 que conduce a un aumento del agonismo y activación de células T CD8⁺.

Tabla 23

Molécula	Tipo	CE ₅₀ (nM)	E _{máx} (pg/ml)
FS22m-063-AA/S70	mAb ²	0,003	23.886
G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3 + anti-hCH2	Combinación de mAb de control positivo	0,02	24.703
G1-AA/S70	mAb PD-L1	0,02	19.477
G1-AA/Lob12.3 + anti-hCH2	mAb CD137	0,36	17.833
FS22m-063-AA/HeID1.3	mAb ² simulado	n/a	3.854

N/A significa - no aplicable ya que la señal baja no permitió la determinación de CE₅₀

- 10 Habiendo mostrado actividad *in vitro* y actividad superior a los controles de anticuerpo positivo, fue deseable después probar el mAb² anti-ratón CD137/PD-L1 en un apropiado *in vivo* Modelo de tumor de ratón singénico.

Ejemplo 14: Caracterización *in vivo* de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón

14.1 Actividad de mAb² anti- CD137/PD-L1 de ratón en un modelo de tumor de ratón singénico CT26

- 15 Habiendo mostrado que el Fcab FS22m-063 es capaz de dirigir el agrupamiento y la activación de CD137 *in vitro*, era deseable ensayar su capacidad para activar CD137 *in vivo*.

Preparación de Fcab FS22m-063 en formato de mAb² para el ensayo en ratones *in vivo*

Se preparó un mAb² que comprendía el Fcab anti-CD137 de ratón, FS22m-063, y una región Fab específica para PD-L1 usando una metodología similar al mAb² modelo producido el **Ejemplo 3.2** y se ensayó para determinar la actividad antitumoral *in vivo* en un modelo de tumor de ratón singénico CT26.

- 20 Controles: G1/Lob12.3, G1-AA/Lob12.3, G1/S70, G1-AA/4420.

Se produjeron anticuerpos de control para los experimentos *in vivo* uniendo la región pesada variable del anticuerpo anti-PD-L1 S70 (clon YW243.55.S70 de US 8.217.149 B2) a la región constante de IgG1 humana (G1m17) que contenía la mutación LALA, y la región ligera variable del anticuerpo S70 se unió a la región constante humana (Lm1) a través de la región J kappa humana. El anticuerpo anti-CD137 de ratón Lob12.3 (Taraban *et al.*, 2002) en formato de IgG1 humana con y sin la mutación LALA en la región constante se usó como anticuerpo de control positivo anti-CD137 de ratón. El mAb² se generó reemplazando el dominio CH3 de la construcción reformateada descrita anteriormente con FS22m-063 y se designó 'FS22m-063-AA/S70'.

- 30 Los modelos de ratón singénicos se aceptan como sistemas murinos apropiados para ensayar el efecto antitumoral de inhibir dianas terapéuticas y se han usado ampliamente para validar el desarrollo de agentes terapéuticos humanos. El modelo de tumor singénico CT26 se usó en este experimento ya que se sabe que los tumores CT26 son altamente inmunogénicos (Lechner *et al.*, 2013) y responden parcialmente a la monoterapia con anticuerpos anti-CD137 (Kim *et al.*, 2008) y expresan PD-L1 (Kleinovink *et al.*, 2017).

- 35 Se dejaron reposar ratones hembra Balb/c (Charles River) de 8-10 semanas de edad y que pesaban 20-25 g cada uno durante una semana antes del inicio del estudio. Se suministró a todos los animales un microchip y se les administró un identificador único. Cada cohorte tenía 12 ratones. La línea celular de carcinoma de colon CT26 (S. Rosenberg, NIH) se expandió inicialmente, se almacenó y después se cribó previamente por IDEXX Bioresearch para detectar patógenos usando el protocolo IMPACT I y se mostró que estaba libre de patógenos.

- 40 Cada animal recibió 0,1 x 10⁶ células inyectadas por vía subcutánea en el flanco izquierdo en 100 µl de DMEM. 7 días después de la inoculación de células tumorales, se retiraron del estudio los ratones que no tenían tumores en este punto.

El mAb² FS22m-063-AA/S70 y los anticuerpos de control (G1/Lob12.3, G1-AA/Lob12.3 (controles positivos anti-CD137), G1/S70 (control positivo anti-PD-L1), G1-AA/4420 (control de isotipo) se inyectaron por vía intraperitoneal en ratones a 20 µg por ratón (una concentración final de ~1 mg/kg) en DPBS + arginina 1 mM + Tween 80 0,05. Cada ratón recibió la molécula de mAb² o anticuerpo de control o una combinación de dos anticuerpos de control mediante inyección intraperitoneal (IP) de 200 µl los días 7, 9 y 11 después de la inoculación del tumor. Se tomaron mediciones precisas de los tumores, se realizó cualquier dosificación de fármaco debida el día en cuestión, y los ratones se pusieron bajo observación estrecha durante el resto del estudio. Las mediciones del volumen tumoral se tomaron con calibradores para determinar el eje más largo y el eje más corto del tumor. Se usó la siguiente fórmula para calcular el volumen tumoral:

$$L \times (S^2) / 2$$

Donde L = eje más largo; S = eje más corto

Como se muestra en la **Figura 12**, el mAb² FS22m-063-AA/S70 mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con algunos de los anticuerpos de control. Se mostró significación estadística por pares para las tasas de crecimiento durante todo el tiempo del estudio usando el análisis de modelo mixto que comparaba todos los grupos. Ninguno de los ratones mostró signo de toxicidad manifiesta y todos los tratamientos fueron bien tolerados, lo que indica que un direccionamiento biespecífico frente a CD137 y PD-L1 no induce una toxicidad significativa.

Todos los animales que contenían tumores que medían igual o inferior a 62,5 mm³ se contaron como animales completamente respondedores (véase la **Tabla 24**). El 28% de los animales tratados con G1/Lob12.3 (control positivo anti-CD137 sin mutación LALA) se consideraron libres de tumores al final del estudio, mientras que el 7 % de los animales tratados con G1-AA/Lob12.3 (control positivo anti-CD137 con la mutación LALA) y el 0 % de los ratones tratados con FS22m-063-AA/S70 (Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un formato de mAb² PD-L1 modelo) se consideraron sin tumor. FS22m-063-AA/S70 induce una inhibición significativa del crecimiento tumoral, en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con ratones tratados con IgG de control. Ningún animal tratado con G1-AA/4420 (control de IgG) o G1/S70 (control positivo de PD-L1) estaba libre de tumor al final del estudio. Los gráficos en la **Figura 17** muestran las mediciones del crecimiento tumoral en mm³ para cada animal a lo largo del tiempo.

Tabla 24: Número y porcentaje de ratones sin tumor al final del estudio en el estudio de tumor singénico CT26.

Compuesto	Ratones sin tumor al final del estudio
G1-AA/4420	0/13 (0 %)
G1-AA/Lob12.3	1/14 (7 %)
G1/S70	0/14 (0 %)
G1/Lob12.3	4/14 (28 %)
G1-AA/Lob12.3 + G1/S70	1/14 (7 %)
FS22m-063-AA/S70	0/14 (0 %)

El estudio muestra que, en ratones con un sistema inmunitario completamente funcional, en un modelo de tumor de ratón singénico CT26, el agonismo de CD137, presumiblemente como resultado de la reticulación a través de PD-L1, conduce a una reducción en el crecimiento tumoral, presumiblemente a través del aumento de la actividad citotóxica de las células T CD8⁺ en el tumor.

El análisis de supervivencia (**Figura 18** y **Tabla 25**) mostró que el FS22m-063-AA/S70 indujo un beneficio de supervivencia significativo en comparación con el control de isotipo (G1-AA/4420). La **Tabla 25** muestra un resumen de la supervivencia mediana en días para cada grupo y análisis estadísticos por pares (rango logarítmico) en modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con G1-AA/4420 (control de IgG), la combinación de G1/S70 más G1-AA/Lob12.3 y FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un formato de mAb² de PD-L1 modelo). FS22m-063-AA/S70 dio como resultado una supervivencia significativamente aumentada en comparación con los ratones tratados con control de IgG. FS22m-063-AA/S70 no mostró un beneficio de supervivencia significativo sobre la combinación de G1/S70 + G1-AA/Lob12.3.

Tabla 25: Mediana de los tiempos de supervivencia para animales tratados con cada compuesto.

Compuesto	Mediana de Supervivencia (Días)	Valores p de rango logarítmico	
FS22m-063-AA/S70	30,5		
G1/S70 + G1-AA/Lob12.3	27	0,2235	Ns
G1-AA/4420	26	0,0058	**

Habiendo mostrado que, en ratones con un sistema inmunitario completamente funcional, en un modelo de tumor de ratón singénico CT26, el agonismo de CD137, presumiblemente como resultado de la reticulación a través de PD-L1, conduce a una reducción en el crecimiento tumoral, presumiblemente a través de la actividad citotóxica aumentada de las células T CD8⁺ en el tumor, se repitió el estudio con las siguientes desviaciones. El mAb² FS22m-063-AA/S70 y los anticuerpos de control G1-AA/Lob12.3 (control positivo anti-CD137), G1/S70 (control positivo anti-PD-L1), G1-AA/HeID1.3 (control de isotipo) se inyectaron intraperitonealmente en ratones a 200 µg por ratón (una concentración final de ~10 mg/kg) en DPBS + arginina 1 mM + Tween 80 0,05. Cada ratón recibió la molécula de mAb² o el anticuerpo de control o una combinación de dos anticuerpos de control mediante una inyección intraperitoneal (IP) de 200 µl los días 7, 9 y 11 después de la inoculación del tumor.

El tratamiento con FS22m-063-AA/S70 dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral (mostrado como la media del volumen tumoral en la **Figura 19**) en comparación con los anticuerpos de control.

El análisis de supervivencia (**Figura 20** y **Tabla 26**) mostró que el FS22m-063-AA/S70 indujo un beneficio de supervivencia significativo en comparación con el control de isotipo (G1-AA/HeID1.3) y G1/S70. No hubo un beneficio de supervivencia significativo sobre G1-AA/Lob12.3.

La **Tabla 26** muestra un resumen de la mediana de supervivencia en días para cada grupo y análisis estadísticos por pares (rango logarítmico) en modelo de tumor singénico CT26 crecido por vía subcutánea en ratones Balb/c tratados con G1-AA/HeID1.3 (control de IgG), G1/S70 (control positivo anti-PD-L1), G1-AA/Lob12.3 (control positivo anti-CD137) y FS22m-063-AA/S70 (Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un formato de mAb² de PD-L1 modelo). FS22m-063-AA/S70 indujo una supervivencia significativa en un modelo de tumor singénico CT26 en comparación con ratones tratados con control de IgG y ratones tratados con control positivo de CD137.

Tabla 26: Resumen de la mediana de supervivencia en días para cada grupo y análisis estadísticos por pares (rango logarítmico) en modelo de tumor singénico CT26.

Compuesto	Mediana de Supervivencia (días)	Valores p de rango logarítmico	
FS22m-063-AA/S70	48,5		
G1/S70	23,5	0,0057	**
G1-AA/Lob12.3	28	0,131	Ns
G1-AA/HeID1.3	27	0,0149	*

14.2 Actividad de respuesta a la dosis de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en un modelo de tumor de ratón singénico CT26

Actividad antitumoral de respuesta a la dosis

El mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70 mostró actividad antitumoral en el modelo de tumor singénico CT26 a una dosis de 20 µg por ratón (~1 mg/kg) dosificado tres veces cada dos días (q2dx3). Para investigar la dosis óptima del mAb² FS22m-063-AA/S70 *in vivo*, se ensayó un intervalo de dosis (2, 6, 20 y 200 µg/ratón, equivalente a aproximadamente 0,1, 0,3, 1 y 10 mg/kg) en el modelo CT26 en un programa de dosificación q2dx3 como se describió anteriormente comenzando 7 días después de la inoculación de las células tumorales. El anticuerpo de control negativo G1-AA/4420 se incluyó a una dosis de 200 µg por ratón (~10 mg/kg) con la misma programación. El anticuerpo de control positivo G1/Lob12.3 se incluyó a una dosis subóptima de 20 µg por ratón (~1 mg/kg) con la misma programación.

Seguendo el mismo protocolo que se ha descrito en el **Ejemplo 14.1**, se dejaron reposar ratones hembra Balb/c (Charles River) de 8-10 semanas de edad y que pesaban 20-25 g cada uno durante una semana antes del inicio del estudio. Se suministró a todos los animales un microchip y se les administró un identificador único. Cada cohorte tenía 12 ratones. La línea celular de carcinoma de colon CT26 (ATCC CRL-2638) se expandió inicialmente, se almacenó y después se cribó previamente por IDEXX BioResearch para detectar patógenos usando el protocolo IMPACT I y se mostró que estaba libre de patógenos. Cada animal recibió $0,1 \times 10^5$ células inyectadas por vía subcutánea en el flanco izquierdo en 100 μ l de DMEM. 7 días después de la inoculación de las células tumorales, se retiraron del estudio los ratones que no tenían tumores en este punto.

En el día 7 del estudio, el mAb² FS22m-063-AA/S70 se inyectó intraperitonealmente en ratones a una concentración final según el intervalo de dosis descrito anteriormente. Se inyectaron intraperitonealmente anticuerpos de control (G1/Lob12.3 (anticuerpo de control positivo para CD137), G1-AA/4420 (control de isotipo)) en ratones a una concentración final de 20 μ g por ratón (~1 mg/kg) y 200 μ g por ratón (~10 mg/kg) respectivamente en DPBS + arginina 1 mM + Tween 80 0,05. Cada ratón recibió la molécula de mAb² o anticuerpo de control mediante inyección intraperitoneal (IP) de 200 μ l los días 7, 9 y 11 después de la inoculación del tumor (q2dx3). Se tomaron mediciones precisas de los tumores, se realizó cualquier dosificación de fármaco debida el día en cuestión, y los ratones se pusieron bajo observación estrecha durante el resto del estudio. Las mediciones del volumen tumoral se tomaron con calibradores para determinar el eje más largo y el eje más corto del tumor como se describe en el **Ejemplo 14.1**.

Como se muestra en la **Figura 13A**, el mAb² FS22m-063-AA/S70 mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con el control de isotipo (G1-AA/4420) cuando se dosificó a ~0,3 mg/kg hasta ~10 mg/kg. La significación estadística se mostró usando el análisis de modelo mixto que comparaba todos los grupos. El análisis de supervivencia, **Figura 13B** y **Tabla 27**, muestra que el mAb² FS22m-63-AA/S70 induce un beneficio de supervivencia estadísticamente significativo en comparación con el control de isotipo en el modelo singénico CT26 cuando se dosifica a niveles por encima de 0,3 mg/kg. Significación estadística realizada usando la prueba de rango logarítmico (Mantel Cox). * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$. Ninguno de los ratones mostró signo de toxicidad manifiesta y todos los tratamientos fueron bien tolerados.

Tabla 27

Tratamiento	Mediana de Supervivencia (días)	Significación estadística (prueba de rango logarítmico)			
		FS22m-063-AA/S70			
		10 mg/kg	1 mg/kg	0,3 mg/kg	0,1 mg/kg
FS22m-063-AA/S70 10 mg/kg	39				
FS22m-063-AA/S70 1 mg/kg	29	ns			
FS22m-063-AA/S70 0,3 mg/kg	24	***	*		
FS22m-063-AA/S70 0,1 mg/kg	21	****	***	**	
G1-AA/4420 10 mg/kg	21	****	**	*	ns

NS significa no significativo

El estudio muestra que, en ratones con un sistema inmunitario completamente funcional, en un modelo de tumor de ratón singénico CT26, el agonismo de CD137, presumiblemente como resultado de la reticulación a través de PD-L1, conduce a una reducción dependiente de la dosis en el crecimiento tumoral y un aumento dependiente de la dosis en la supervivencia, presumiblemente a través del aumento de la actividad citotóxica de las células T CD8⁺ en el tumor.

14.3 Mecanismo de acción de respuesta a la dosis

El mecanismo de acción del mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón se evaluó en el mismo modelo de ratón que portaba tumor CT26 como se describe en el **Ejemplo 14.2**. Se analizó sangre, bazo y tejido tumoral de portadores de tumor CT26 tratados con FS22m-063-AA/S70 a cuatro dosis diferentes (2, 6, 20 y 200 μ g/ratón, equivalentes a aproximadamente 0,1, 0,3, 1, 10 mg/kg), así como anticuerpo de control negativo G1-AA/4420 para detectar marcadores de activación y proliferación de células T que se sabe que son efectos aguas abajo del agonismo de CD137 (Fisher *et al.*, 2012).

5 Siguiendo el mismo protocolo de estudio que se describe en este ejemplo el día 9 (48 horas después de la primera dosis), el día 11 (48 horas después de la segunda dosis) y el día 15 (96 horas después de la tercera y última dosis) se recogió sangre en tubos que contenían EDTA por punción cardíaca, y se recogió bazo y tejido tumoral por disección. El bazo y el tejido tumoral se desagregaron a una suspensión de células individuales mediante métodos mecánicos y enzimáticos estándar. Los glóbulos rojos se lisaron una vez en tampón de lisis de glóbulos rojos (eBioscience, no. de cat. 00-4300-54) según las instrucciones del fabricante.

Los glóbulos rojos de la sangre no coagulada se lisaron dos veces en tampón de lisis de glóbulos rojos (eBioscience, no. de cat. 00-4300-54) según las instrucciones del fabricante.

10 Todas las muestras se trataron entonces de la misma manera. Las células se lavaron después una vez con PBS y las muestras se tiñeron con colorante de viabilidad fijable (Invitrogen, no. de cat. 65-0865-14) a una dilución 1:3.000 en PBS siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron para citometría de flujo para detectar marcadores de la superficie celular con un panel de tinción de anticuerpos (todos excepto los anticuerpos Ki67 y FoxP3) (**Tabla 28** abajo) en presencia de bloqueo de Fc (eBioscience no. de cat. 14-0161-86 a 1:50) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se fijaron y permeabilizaron luego con el kit de tinción eBioscience Foxp3 (eBioscience no. de cat. 00-5523-00) según las instrucciones del fabricante. Las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de permeabilización con anticuerpos Ki67 y Foxp3 en presencia de bloqueo de Fc (todos en dilución 1:100) y se incubaron 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células se lavaron después una vez con tampón de permeabilización y se resuspendieron en 200 µl de PBS + BSA al 0,5 %. Las células se analizaron después en un citómetro de flujo BD Fortessa. Los datos se analizaron con FlowJoX, Excel y GraphPad Prism. Los datos representados representan la abundancia y proliferación de células T observadas a lo largo del tiempo para subpoblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺. Los datos se presentan como el porcentaje de la población parental según la descripción de la población en el eje Y.

25 Como se muestra en la **Figura 14B**, la relación porcentual CD8⁺:CD4⁺ aumenta a favor de las células T CD8⁺, tanto en el tumor como en la periferia en línea con una dosis aumentada de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón, indicando que el tratamiento provoca un desplazamiento en el equilibrio de las dos subpoblaciones de células T que probablemente sería como resultado del aumento de los números de células T CD8⁺. Sobre el día 15, el marcador de proliferación en las células T CD8⁺ aumenta en línea con el nivel de dosis de tratamiento, observándose la proliferación más alta en el nivel de dosis más alto. Esto indicaría que las células T CD8⁺ están proliferando, lo que es un signo de activación y explicaría el aumento de los números de células T CD8⁺ que dan como resultado un aumento de la relación de células T CD8⁺:CD4⁺.

35 En general, este estudio ha mostrado que el aumento del nivel de dosis de anti-CD137/PD-L1 de ratón da como resultado más células T CD8⁺ en el tumor. El papel principal de las células T CD8⁺ (a menudo también denominadas linfocitos citotóxicos) es la destrucción de células infectadas o malignas a través de 3 mecanismos principales: 1) liberación de citocinas, por ejemplo, TNFα e IFN-γ, 2) producción y liberación de gránulos citotóxicos y 3) expresión de FasL. La presencia de más células T CD8⁺ en el tumor después del tratamiento con anti-CD137/PD-L1 de ratón presumiblemente da como resultado una actividad citotóxica a través de estos mecanismos contra el tumor, dando como resultado el control tumoral.

Tabla 28

Diana	Clon de Anticuerpo	Fluoróforo	Empresa	No. de cat.
CD45	30-F11	AF700	eBioscience	56-0451-82
CD3	145-2C11	PECy7	eBioscience	25-0031-82
CD4 ⁺	RM4-5	BUV395	BD Biosciences	740208
CD8 ⁺	53-6.7	BUV737	BD Biosciences	564297
FoxP3	Fjk-16S	PerCP-Cy5.5	Invitrogen	45-5773-82
CD44	IM7	BV650	BioLegend	103049
CD62L	MEL-14	Bv421	BioLegend	104435
CD69	H1.2F3	Bv510	BioLegend	104532

Diana	Clon de Anticuerpo	Fluoróforo	Empresa	No. de cat.
Ki67	16A8	647	BioLegend	652407
PD-L1	10F.9G2	Bv785	BioLegend	124331
IgG	MK1A6	FITC	Bio-Rad	MCA647F
Viabilidad	n/a	780	Invitrogen	65-0865-14

n/a significa no aplicable

14.4 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en un modelo de tumor de ratón singénico MC38

Los modelos de ratón singénicos se aceptan como sistemas murinos apropiados para ensayar el efecto antitumoral de inhibir dianas terapéuticas y se han usado ampliamente para validar el desarrollo de agentes terapéuticos humanos. El modelo de tumor singénico MC38 se usó en este experimento ya que se sabe que los tumores MC38 son altamente inmunogénicos y responden a la monoterapia con anticuerpos anti-CD137 (Kocak *et al*, 2006) y expresan PD-L1 (Juneja *et al*, 2017).

Se dejaron reposar ratones hembra C57BL/6 (The Jackson Laboratory) de 9-10 semanas de edad y que pesaban de 18 a 24 g cada uno durante una semana antes del inicio del estudio. Se suministró a todos los animales microchips y se les administró un identificador único. Cada cohorte tenía 12 ratones. La línea celular de carcinoma de colon MC38 (National Cancer Institute, EE. UU.) se expandió inicialmente, se almacenó y después se cribó previamente para detectar patógenos y se mostró que estaba libre de patógenos. Cada animal recibió 1×10^6 células inyectadas por vía subcutánea en el flanco derecho en 100 μ l en medio de cultivo libre de suero (medio de Eagle modificado por Dulbecco). 7 días después de la inoculación de las células tumorales, se retiraron del estudio los ratones que no tenían tumores en este punto.

El mAb² FS22m-063-AA/S70 y los anticuerpos de control (G1-AA/Lob12.3 (control positivo de CD137), G1-AA/S70 (control positivo de PD-L1), G1-AA/4420 (control de isotipo)) se inyectaron intraperitonealmente en ratones a una concentración fija de 20 μ g por dosis en DPBS + arginina 1 mM + Tween 80 0,05. Cada ratón recibió la molécula de mAb² o anticuerpo de control por inyección intraperitoneal (IP) de 200 μ l los días 7, 9 y 11 después de las inoculaciones tumorales. Se tomaron mediciones precisas de los tumores, se realizó cualquier dosificación de fármaco debida el día en cuestión, y los ratones se pusieron bajo observación estrecha durante el resto del estudio. Las mediciones del volumen tumoral se tomaron con calibradores para determinar el eje más largo y el eje más corto del tumor. Se usó la siguiente fórmula para calcular el volumen tumoral:

$$L \times (S^2) / 2$$

Donde L = eje más largo; S = eje más corto

Como se muestra en la **Figura 15**, el mAb² FS22m-063-AA/S70 mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación con los ratones tratados con cualquiera de los anticuerpos de control. Se mostró significación estadística por pares para las tasas de crecimiento durante todo el tiempo del estudio usando un análisis de modelo mixto que comparaba todos los grupos. Como se muestra en la **Tabla 29**, inesperadamente, todos los ratones tratados con mAb² FS22m-063-AA/S70 no tenían tumor al final del estudio, en comparación con solo 4 de 12 ratones tratados con una combinación de anticuerpos anti-PD-L1 y anti-CD137 (G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3) o los anticuerpos de PD-L1 o CD137 solos. Los gráficos en la **Figura 21** muestran las mediciones del crecimiento tumoral en mm³ para cada animal a lo largo del tiempo.

Tabla 29

Grupo	% de Ratones sin Tumor	Número de Ratones sin Tumor
G1-AA/Lob12.3	16 %	2/12
G1-AA/4420	0 %	0/12
G1-AA/S70	16 %	2/12
G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3	33 %	4/12

Grupo	% de Ratones sin Tumor	Número de Ratones sin Tumor
FS22m-063-AA/S70	100 %	12/12

El estudio muestra que, en ratones con un sistema inmunitario completamente funcional, en un segundo modelo de tumor singénico, MC38, que muestra una respuesta subóptima a 1 mg/kg de mAb de PD-L1, sorprendentemente, 1 mg/kg de mAb² de CD137/PD-L1 induce regresión tumoral completa en el 100 % de los ratones tratados.

- 5 El análisis de supervivencia (**Figura 22 y Tabla 30**) muestra el resumen de la mediana de la supervivencia en días para cada grupo de tratamiento tratado con 3 dosis de G1-AA/4420 (control de isotipo), G1-AA/S70 (control positivo anti-PD-L1), G1-AA/Lob12.3 (control positivo anti-CD137), la combinación de G1-AA/S70 más G1-AA/Lob12.3 y FS22m-063-AA/S70 (el Fcab anti-CD137 de ratón FS22m-063 en un formato de mAb² de PD-L1 modelo). La **Tabla 30** también muestra análisis estadísticos por pares (rango logarítmico). FS22m-063-AA/S70 induce la supervivencia completa en un modelo de tumor singénico MC38, con una supervivencia del 100 % de los animales al final del estudio (marcados "no definida"), en comparación con los ratones tratados con control de IgG.

Tabla 30: Mediana de supervivencia en el modelo tumoral MC38

Compuesto	Mediana de Supervivencia (Días)	Valores p de rango logarítmico	
FS22m-063-AA/S70	no definida		
G1-AA/S70 + G1-AA/Lob12.3	33,5	0,0006	***
G1-AA/Lob12.3	25	0,0001	***
G1-AA/S70	28	<0,0001	****
G1-AA/4420	20	<0,0001	****

14.5 Actividad de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en un modelo de tumor de ratón singénico B16.F10

- 15 Se usó el modelo de tumor singénico B16.F10 para ensayar la actividad antitumoral del mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón (FS22m-063-AA/S70) *in vivo*. Este modelo se considera más desafiante para tratar con anticuerpos terapéuticos (Baird, J. R., *et al*, 2013). El anticuerpo G1-AA/4420 se usó como control de isotipo en el estudio. No se ha mostrado previamente que el modelo de tumor singénico B16.F10 sea sensible a anticuerpos agonistas de CD137. Sin embargo, los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) aislados de tumores B16.F10 expresan CD137 (Curran. M., *et al*, 2013).
- 20 Se aclimataron ratones hembra C57BL/6 (Charles River) de 8-10 semanas de edad y que pesaban 20-25 g cada uno durante una semana antes del inicio del estudio. Se suministró a todos los animales microchips y se les administró un identificador único. Cada cohorte tenía 10 ratones. La línea celular de melanoma B16.F10 (ATCC no. de cat. CRL-6475) se expandió inicialmente, se almacenó y después se crió previamente por IDEXXX Bioresearch para detectar patógenos usando el protocolo IMPACT I y se mostró que estaba libre de patógenos. Se descongelaron células
- 25 B16.F10 del almacenamiento a -150 °C y se añadieron a 20 ml de DMEM (Gibco, 61965-026) con FCS al 10 % (Gibco, 10270-106) en un matraz de cultivo tisular T175. Cada animal recibió 1x10⁶ células inyectadas por vía subcutánea en el flanco izquierdo.
- 30 Se inyectaron 20 µg de cada anticuerpo en ratones (~1 mg/kg) en 200 µl de PBS. Cada ratón recibió los anticuerpos mediante inyección intraperitoneal (IP) cada 2 días durante 3 dosis empezando el día 7 después de la inoculación de las células tumorales. Los volúmenes tumorales se determinaron midiendo usando calibradores (como se describe en el **Ejemplo 14.1**) y se realizó cualquier dosificación de fármaco debida al día en cuestión, y los ratones se sometieron a observación estrecha durante el resto del ensayo. Los volúmenes tumorales se calcularon como se describe en el **Ejemplo 14.1**.
- 35 El ensayo se detuvo cuando se alcanzaron los criterios de valoración humanos en base al volumen y condición del tumor. El análisis estadístico de las tasas de crecimiento se llevó a cabo por pares durante todo el tiempo del estudio usando el análisis de modelo mixto.

Hubo una ralentización significativa de la tasa del crecimiento tumoral para el mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en comparación con el anticuerpo de control de isotipo G1-AA/4420 (**Figura 16**). El FS22m-063-AA/S70 indujo una inhibición parcial del crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico B16.F10 en comparación con los ratones tratados con control de IgG. Los gráficos en la **Figura 23** muestran las mediciones del crecimiento tumoral en mm³ para cada animal a lo largo del tiempo.

El análisis de supervivencia (**Tabla 31**) muestra el resumen de la mediana de supervivencia en días para cada grupo y análisis estadísticos por pares (rango logarítmico) en el modelo de tumor singénico B16.F10 crecido por vía subcutánea en ratones C57BL/6 tratados con G1-AA/4420 (control de isotipo) y el mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70. El FS22m-063-AA/S70 indujo un aumento de la supervivencia en un modelo de tumor singénico B16.F10 en comparación con ratones tratados con control de IgG.

Tabla 31: Mediana de supervivencia en el modelo de tumor singénico B16.F10

Compuesto	Mediana de Supervivencia (Días)	Valores p de rango logarítmico
FS22m-063-AA/S70	23,5	n/a
G1-AA/4420	19	n/a

Este estudio mostró que, en ratones con un sistema inmunitario completamente funcional, en un modelo de tumor de ratón singénico B16.F10, notoriamente difícil de tratar, el agonismo de CD137, presumiblemente como resultado de la reticulación a través de PD-L1, conduce a una reducción en el crecimiento tumoral, presumiblemente a través de la actividad citotóxica aumentada de las células T CD8⁺ en el tumor.

14.6 Farmacología hepática de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en modelo que porta tumor de ratón singénico CT26

El tratamiento con mAb anti-CD137 de pacientes con tumor sólido con urelumab en ensayos clínicos de investigación ha dado como resultado eventos inmunitarios graves relacionados con el tratamiento que se ha mostrado que están relacionados con la dosis de urelumab administrado. Los efectos de estos eventos inmunitarios se manifestaron en el hígado como hepatotoxicidad grave (Segal, N.H., *et al*, 2017).

El trabajo mecanístico preclínico realizado en ratones en donde los animales se dosificaron usando anticuerpos de herramienta agonistas de CD137 ha mostrado una hepatotoxicidad similar. Estos estudios mostraron un requisito para las células T y CD137 en la hepatotoxicidad resultante (Niu, L., *et al* 2007 y Dubrot J, *et al*. 2010). Aunque se entiende mal, también se ha mostrado que la interacción entre los compartimentos mieloide y de células T es importante para iniciar la cascada inflamatoria que conduce a daño hepático y hepatotoxicidad (Bartkowiak T *et al.*, 2018). Por lo tanto, estos modelos animales tienen relevancia traslacional para la clínica en la predicción del riesgo de hepatotoxicidad en pacientes humanos tras la administración de otros agonistas de CD137 y específicamente un mAb² de CD137/PD-L1.

Los ratones del estudio de tumor singénico CT26 descrito en el **Ejemplo 14.1** no mostraron signos evidentes de toxicidad después de la dosificación repetida con mAb² FS22m-063-AA/S70 que tiene capacidad agonista de CD137 tras la reticulación de PD-L1. Para determinar si en estos animales la activación inmunitaria observada como resultado del tratamiento con ~1 mg/kg de mAb² FS22m-063-AA/S70 (que se correlacionó con la actividad inmunitaria antitumoral) se correlacionaba con la hepatotoxicidad, se tomaron muestras de hígado en la necropsia para la evaluación histológica. Los ratones tratados con mAb² FS22m-063-AA/S70 y los ratones de control se sometieron a necropsia 4, 7 y 14 días después de la última administración (tres ratones por grupo por punto de tiempo) y las muestras de hígado fueron fijadas en formalina y embebidas en parafina. A continuación, se cortaron secciones de hígado y se sometieron a evaluación histopatológica mediante tinción con hematoxilina y eosina y puntuación de parámetros de inflamación y daño hepático por un patólogo certificado. Los métodos para la preparación de tejidos y la tinción histopatológica por hematoxilina y eosina están muy estandarizados y son bien conocidos en la técnica.

Se usó un sistema de puntuación para evaluar la patología hepática en las secciones teñidas con hematoxilina y eosina. Se puntuó la patología del hígado correspondiente a necrosis hepatocelular, inflamación del tracto portal, hepatocitos degenerativos y aumento de las mitosis. La frecuencia de ratones que muestran efectos mínimos, ligeros, moderados y marcados dentro de cada grupo se muestra en la **Tabla 32**.

Los animales tratados con mAb² FS22m-063-AA/S70 tienen una patología hepática mínima. Específicamente:

- necrosis hepatocelular de mínima a ligera con infiltrado de linfocitos mixtos en el parénquima
- células inflamatorias mixtas de mínimas a ligeras en los tractos periportales
- hepatocitos degenerativos mínimos

- mitosis incrementadas de mínimas a marcadas

Tabla 32: Hallazgos hepáticos

Higado	G1/4420 (control de isotipo)			FS22m-063-AA/S70		
	D4	D7	D14	D4	D7	D14
Necrosis hepatocelular, degeneración con células inflamatorias mixtas (parenquimatosas)						
Mínima	3	3	3	2	2	3
Ligera	0	0	0	1	1	0
Células inflamatorias mixtas (+/-SCN) en tractos portales						
Mínimas	1	0	0	1	3	3
Ligeras	0	0	0	1	0	0
Hepatocito degenerativo						
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Aumento de las mitosis						
Mínimo	1	1	1	2	2	3
Ligero	1	0	1	1	0	0
Moderado	0	0	0	0	0	0
Marcado	0	0	0	0	0	0

5 No se considera que estos hallazgos representen hepatotoxicidad grave, como se observa con otros ejemplos de anticuerpos agonistas anti-CD137.

Dada la relevancia de los estudios preclínicos en ratones para la evaluación del riesgo de hepatotoxicidad grave en pacientes humanos tratados con agentes agonistas de CD137, estos resultados indican que un mAb² que agoniza CD137 mediante reticulación mediada a través de la unión de PD-L1 tiene un bajo riesgo de inducir hepatotoxicidad en pacientes humanos tratados a dosis terapéuticas.

10 *14.7 Ocupación de receptores tumorales y periféricos y efectos farmacodinámicos de mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en un modelo de tumor de ratón singénico CT26*

15 En el **Ejemplo 14.3**, el mAb² anti-CD137-PD-L1 de ratón FS22m-063-AA/S70 mostró la capacidad de aumentar las células T CD8⁺ en el tumor después de múltiples dosis. Para investigar el grado de unión de la diana en las células T, el bloqueo de PD-L1 y el efecto que tiene FS22m-063-AA/S70 sobre la proliferación de las células T, se realizó un estudio farmacodinámico de dosis única en el mismo modelo de tumor singénico CT26 como se describe en el **Ejemplo 14.1**.

Se usó el anticuerpo G1-AA/4420 como control. El mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón y los anticuerpos de control para los experimentos *in vivo* se produjeron como se describe en el **Ejemplo 14.1**.

20 Siguiendo el mismo protocolo que se ha descrito en el **Ejemplo 14.1**, se dejaron reposar ratones hembra Balb/c (Charles River) de 8-10 semanas de edad y que pesaban 20-25 g cada uno durante una semana antes del inicio del estudio. Se suministró a todos los animales microchips y se les administró un identificador único. Este estudio

comprendía 3 grupos de dosificación, que recibieron anticuerpo de control o mAb² a una de dos dosis durante 8 puntos de tiempo (2h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 192h). Cada cohorte de dosificación tenía 64 ratones (8 ratones por punto de tiempo). La línea celular de carcinoma de colon CT26 (S. Rosenberg, NIH) se expandió inicialmente, se almacenó y después se cribó previamente por IDEXX Bioresearch para detectar patógenos usando el protocolo IMPACT I y se mostró que estaba libre de patógenos. Cada animal recibió 1×10^5 células inyectadas por vía subcutánea en el flanco izquierdo en 100 µl de DMEM. 7 días después de la inoculación de las células tumorales, se retiraron del estudio los ratones que no tenían tumores en este punto.

Cada ratón recibió la muestra de ensayo mediante una inyección intravenosa (IV) de 100 µl el día 11 después de la inoculación del tumor. En los grupos que recibieron mAb², se inyectó FS22m-063-AA/S70 por vía intravenosa en ratones a 20 µg o 200 µg por ratón (una concentración final de ~1 mg/kg y ~10 mg/kg respectivamente) y en el grupo que recibió anticuerpo de control se inyectó G1-AA/4420 (control de isotipo) por vía intravenosa en ratones a 200 µg por ratón (una concentración final de ~10 mg/kg) en DPBS + arginina 1 mM + Tween 80 0,05.

Se evaluó el acoplamiento de receptor tumoral y de sangre periférica y la respuesta farmacodinámica como resultado de la dosificación con el mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón. Se ensayó tejido tumoral y sangre de ratones portadores de tumor CT26 tratados con FS22m-063-AA/S70 (mAb² anti-mCD137/PD-L1) a cada una de las dosis, así como el anticuerpo de control negativo G1-AA/4420, para detectar células T positivas unidas a mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón, proliferación de células T y PD-L1 libre no unido por mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón. También se evaluó la expresión total de CD137.

Se recogió sangre (100 µl) en capilares recubiertos con EDTA mediante sangrado de la vena de la cola y se lisaron dos veces en tampón de lisis de glóbulos rojos (eBioscience no. de cat. 00-4300-54) según las instrucciones del fabricante.

Se recogió tejido tumoral mediante disección y se desagregó a una suspensión de células individuales mediante métodos mecánicos y enzimáticos convencionales. Cualquier glóbulo rojo que quedaba en el tejido tumoral desagregado se lisó una vez en tampón de lisis de glóbulos rojos (eBioscience, no. de cat. 00-4300-54) según las instrucciones del fabricante.

Las células se lavaron una vez con PBS y las muestras se tiñeron con colorante de viabilidad fijable (Invitrogen, no. de cat. 65-0865-14) a una dilución 1:3.000 en PBS siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se tiñeron para detectar marcadores de la superficie celular para citometría de flujo con un panel de tinción de anticuerpos (todos excepto los anticuerpos Ki67 y FoxP3) (**Tabla 33** abajo) en presencia de bloqueo de Fc (eBioscience no. de cat. 14-0161-86 a 1:50) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se fijaron y permeabilizaron luego con el kit de tinción de Foxp3 de eBioscience (eBioscience no. de cat. 00-5523-00) según las instrucciones del fabricante. Las células se resuspendieron en 100 µl de tampón de permeabilización con anticuerpos Ki67 y Foxp3 en presencia de bloqueo de Fc y se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células se lavaron después una vez con tampón de permeabilización y se resuspendieron en 200 µl de PBS + BSA al 0,5 %. Las células se analizaron después en un citómetro de flujo BD Fortessa. Los datos se analizaron con FlowJoX, Excel y GraphPad Prism.

La **Figura 24** muestra el porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ aisladas de sangre o tumores que eran positivas para el anticuerpo anti-IgG unido al mAb² mCD137/PD-L1 en la muestra. Como se muestra en la **Figura 24**, las células T fueron positivas para mAb² anti-mCD137/PD-L1 unido tan pronto como 2 horas después de la administración intravenosa. Hubo una correlación dependiente de la dosis en la longevidad de la unión, con el mAb² anti-mCD137/PD-L1 no detectado más allá de 96 h en células T aisladas de sangre y tumor después de la administración de una dosis de 1 mg/kg, mientras que el mAb² anti-mCD137/PD-L1 se detectó todavía entre 120 h y 192 h después de la administración de una dosis de 10 mg/kg. Como se esperaba, se observó una tinción de fondo mínima para el anticuerpo de control. Las poblaciones de células T aisladas de tumor que eran positivas para mAb² anti-mCD137/PD-L1 fueron mayores al principio en comparación con las células T aisladas de la sangre. Esto podría indicar que los niveles de expresión de la diana, CD137 o PD-L1, eran mayores en las células T aisladas del tumor, de modo que el anti-mCD137/PD-L1 se dirigió más eficazmente al tumor en comparación con las células T en la sangre.

La **Figura 25** muestra la detección de Ki67 como marcador para la proliferación de las células T en células T CD4⁺ y CD8⁺ aisladas de sangre y tumores. Como se indica en la **Figura 25**, cuando se compara con el anticuerpo de control, el mAb² anti-mCD137/PD-L1 dio como resultado aumentos en la frecuencia de células T de sangre periférica positivas para Ki67 lo que indica una respuesta farmacodinámica (PD), es decir, que ambas dianas están o han estado en algún punto acopladas dando como resultado la activación de las células T tal como se observa mediante una respuesta proliferativa, a ambos niveles de dosis ensayados. Dado que las células T infiltrantes de tumores se exponen a un entorno inflamatorio, las poblaciones de células T aisladas de los tumores exhibieron una frecuencia más alta de células T proliferativas positivas para Ki67. Por el contrario, la frecuencia en la línea base de las células T positivas para Ki67 fue mucho menor en la sangre. Ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ parecían responder al tratamiento con anti-mCD137/PD-L1, lo que indica que CD137 en ambos tipos de células se acopló por el mAb² y se agrupan entre sí mediante la unión de PD-L1 que conduce a la señalización de CD137 y la activación de las células T que da como resultado un aumento de la proliferación. El efecto parecía más fuerte para células T CD8⁺ lo que está en línea con que las células T CD8⁺ expresan niveles más altos de CD137 que las células T CD4⁺. Los datos sugieren que se logra el efecto máximo a 1 mg/kg, aunque la duración de la respuesta parece mayor a 10 mg/kg, lo que podría estar

relacionado con una ocupación del receptor más prolongada y, por lo tanto, un mayor acoplamiento de la diana en el nivel de dosis más alto. Cuanto más prolongada sea la ocupación del receptor, mayor será la respuesta de PD. En el tumor, las células T ya son muy proliferativas, y se observó un aumento correlacionado con la dosis en la magnitud de la proliferación tanto en células T CD4⁺ como CD8⁺ a lo largo del tiempo.

- 5 Se añadió a las muestras de los ratones tratados con anticuerpo de control G1-AA/4420 mAb² anti-mCD137/PD-L1 100 nM y actuó como control para el acoplamiento del receptor PD-L1 al 100 %. Esto se mostró por la falta de unión de un anticuerpo anti-mPD-L1 competidor (clon 10F.9G2, véase la **Tabla 33**). Las muestras de tumores y sangre de ratones tratados con anti-mCD137/PD-L1 mostraron bloqueo de PD-L1 casi completo a la dosis de 10 mg/kg durante la duración completa del estudio, como se muestra en la **Figura 26** representado por el 100 % de ocupación del receptor PD-L1. En muestras de ratones tratados con 1 mg/kg de anti-mCD137/PD-L1, el acoplamiento del receptor PD-L1 disminuyó después de aproximadamente 72 h en las células T presentes en sangre y tumores, con el acoplamiento del receptor PD-L1 en las células T presentes en sangre disminuyendo mucho más rápido que en las células T presentes en los tumores. Estos datos indican un bloqueo específico de tumor de PD-L1 que tiene tanto la ventaja de inhibir el eje PD-1/PD-L1 como de retener el mAb² anti-mCD137/PD-L1 en el tumor durante más tiempo que en la sangre, lo que se espera que permita que el efecto completo del fármaco persista en el tumor, mientras que al mismo tiempo limita los efectos fuera de la diana en la periferia.

En general, este estudio mostró que el aumento de la dosis de anti-CD137/PD-L1 de ratón dio como resultado la activación y proliferación de células T CD8⁺ y CD4⁺ en el tumor según se mide por el número de células a las que se unió el mAb², acoplamiento del receptor PD-L1 por el mAb² y expresión aumentada de Ki67 como marcador de proliferación. Las células CD8⁺ y CD4⁺ activadas y proliferativas también se observaron en la sangre periférica, actuando como un marcador adicional de la actividad inducida por anti-CD137/PD-L1 de ratón. Esta activación de las células T dependiente de la dosis apoya la inhibición del crecimiento tumoral observada previamente en el **Ejemplo 14** tras la administración de anti-CD137/PD-L1 de ratón.

El papel principal de las células T CD8⁺ (a menudo también denominadas linfocitos citotóxicos) es la destrucción de células infectadas o malignas a través de 3 mecanismos principales: 1) liberación de citocinas (por ejemplo, TNF α e IFN- γ), 2) producción y liberación de gránulos citotóxicos y 3) expresión de ligando Fas. Se espera que la presencia de más células T CD8⁺ en el tumor después del tratamiento con anti-CD137/PD-L1 de ratón den como resultado actividad citotóxica a través de estos mecanismos contra el tumor, dando como resultado control tumoral. Mientras que las células T CD8⁺ son las células T citotóxicas principales responsables de la muerte de células tumorales, las células T CD4⁺ desempeñan un papel fundamental en la inmunidad adaptativa reconociendo los péptidos presentados por las moléculas del MHC de clase II, activándose y produciendo IFN- γ y TNF α que median ambos la protección de tumores (Zanetti, 2015, Ji, 2015).

Tabla 33

Diana	Clon de Anticuerpo	Fluoróforo	Empresa	No. de cat.
CD45	30-F11	AF700	eBioscience	56-0451-82
CD3	145-2C11	BUV737	BD Biosciences	564618
CD4	RM4-5	Bv786	BD Biosciences	563727
CD8	53-6.7	BUV395	BD Biosciences	563786
FoxP3	Fjk-16S	PerCP-Cy5.5	Invitrogen	45-5773-82
CD4+4	IM7	BV650	BioLegend	103049
CD62L	MEL-14	Bv421	BioLegend	104435
CD137	17B5	PE	BioLegend	106105
Ki67	16A8	PE-Cy7	BioLegend	652426

Diana	Clon de Anticuerpo	Fluoróforo	Empresa	No. de cat.
PD-L1	10F.9G2	Bv605	BioLegend	124321
IgG	MK1A6	FITC	Bio-Rad	MCA647F
Viabilidad	n/a	e780	Invitrogen	65-0865-14

n/a significa no aplicable

Ejemplo 15: Farmacocinética de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en ratón

Con el fin de determinar la farmacocinética del mAb² anti-CD137/PD-L1 en ratones, se administraron a ratones hembra C57BL/6 (véase el **Ejemplo 14.4**) pero sin tumores MC38, es decir, ratones sin tumor, 100 µl de mAb² anti-CD137/PD-L1 a 4 dosis (25 mg/kg, 10 mg/kg, 3 mg/kg y 1 mg/kg) y se monitorizaron durante 384 horas.

Se realizó un micromuestreo de aproximadamente 20 µl de sangre completa a las 2, 6, 24, 48, 96 y 384 horas, y se procesó para aislar aproximadamente 5 µl de suero. La cantidad de mAb² anti-CD137/PD-L1 presente en cada punto temporal se determinó usando el sistema Gyrolab xPlore de Gyros Protein Technologies. Se realizó un ensayo tipo sándwich usando un Gyrolab Bioaffy 1000 CD (Número de Producto P0004253) con anticuerpo adsorbido de mono de cabra anti-IgG humana (cadena pesada y ligera) biotinilado (Cambridge Bioscience número de producto A80-319B) como anticuerpo de captura e IgG anti-Humana de cabra-AlexaFluor[®] 647 (Cambridge Bioscience número de producto 2040-31) como anticuerpo de detección. Se usó una curva patrón generada en el intervalo de 8.000-0,07 ng/ml para determinar la concentración de la muestra, con muestras que se sometieron a dilución en tampón REXXIP AN según se requería (Gyros número de producto P0004994). Se usaron otros tampones según las recomendaciones del fabricante. Se representó la concentración promedio de muestra de ratones individuales por punto de tiempo (tres ratones por punto de tiempo) (**Figura 27**).

La **Figura 27** muestra la farmacocinética del mAb² anti-CD137/PD-L1, demostrando que el mAb² tiene un aclaramiento terminal comparable a una IgG humana estándar en ratones (Bergman *et al*, 1998).

Ejemplo 16: Respuesta farmacocinética/farmacodinámica a y tolerabilidad de mAb² anti-CD137/PD-L1 humano en monos cynomolgus

Se realizó un estudio preliminar de búsqueda del intervalo de dosis para evaluar la respuesta farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD) a y la tolerabilidad de mAb² anti-CD137/PD-L2 humano en monos cynomolgus. Brevemente, el mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 se administró a monos cynomolgus mediante infusión intravenosa (IV) como una dosis única o como dosis repetidas. Se evaluaron parámetros toxicológicos estándar tales como peso corporal, consumo de alimentos, observaciones clínicas, hematología y química sanguínea para evaluar la tolerabilidad durante la duración del estudio.

El mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 tuvo una semivida terminal de aproximadamente 6 días y generalmente se toleró bien hasta 30 mg/kg dosificado semanalmente según se determinó por los resultados de química clínica y de histopatología). Se observaron niveles de sPD-L1 en suero aumentados (una indicación de acoplamiento directo a la diana y activación celular) en todos los animales el día 1, con el pico alcanzado a las 168 horas después del final de la infusión, después de lo cual los niveles disminuyeron en línea con la disminución en los niveles sistémicos del mAb² FS22-172-003-AA/E12v2.

De manera consistente con los hallazgos del estudio para evaluar la respuesta de PD del mAb² anti-CD137/PD-L1 de ratón en un modelo de tumor sintético de ratón (**Ejemplo 15**), también se observó un aumento relacionado con el fármaco en la proliferación y activación celular en células T de memoria central y memoria efectora CD4⁺ y CD8⁺, que se midieron mediante una expresión aumentada de Ki67. Se observaron cinéticas similares para las células NK y un aumento moderado pero transitorio en el porcentaje relativo y recuentos absolutos de células T reguladoras CD4⁺ (CD4⁺ FoxP3⁺).

Tomados en conjunto, estos resultados indican fuertemente que el mAb² anti-FS22-172-003-AA/E12v2 humano tiene una actividad farmacológica potente *in vivo* en el mono cynomolgus y se tolera bien hasta 30 mg/kg. Además, los datos de PK/PD generados están en línea con los datos de la molécula sustituta (FS22m-063-AA/S70), reforzando la base racional para el uso del mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 en el entorno clínico.

Listado de secuencias

Secuencias de aminoácidos de CDR del mAb E12v2 (Kabat)

CDR1 de VH - SYGIS (SEQ ID NO: 1)

CDR2 de VH - WISAYSGGTNYAQKLQG (SEQ ID NO: 2)

5 CDR3 de VH - DLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: 3)

CDR1 de VL - RASQSIGNRLA (SEQ ID NO: 4)

CDR2 de VL - EASTSET (SEQ ID NO: 5)

CDR3 de VL - QQSYSTPYT (SEQ ID NO: 6)

Secuencias de aminoácidos de CDR de E12v2 (IMGT)

10 CDR1 de VH - GYPFTSYG (SEQ ID NO: 7)

CDR2 de VH - ISAYSGGT (SEQ ID NO: 8)

CDR3 de VH - ARDLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: 9)

CDR1 de VL - QSIGNR (SEQ ID NO: 10)

CDR2 de VL - EAS (SEQ ID NO: 11)

15 CDR3 de VL - QQSYSTPYT (SEQ ID NO: 6)

Secuencia de aminoácidos del dominio VH del mAb E12v2 (SEQ ID NO: 12)

CDR de IMGT (cursiva en negrita); CDR de Kabat (cursiva y subrayada).

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPTIFGVSYYYYWGQGT***LVTVSS**

Secuencia de ácido nucleico del dominio VH del mAb E12v2 (SEQ ID NO: 13)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
TGCAAAGCCTCAGGATACCCCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
AAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAACTACGCTCAAAAGC
TGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAAGTGAATC
TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACTATCTTCGGA
20 GTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTCTGAGC

Secuencia de aminoácidos del dominio VL del mAb E12v2 (SEQ ID NO: 14)

CDR de IMGT (cursiva en negrita); CDR de Kabat (cursiva y subrayada).

*DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRASQSIGNRLAWYQHKPGKAPKLLIYEASTSETGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIK*

Secuencia de ácido nucleico del dominio VL del mAb E12v2 (SEQ ID NO: 15)

GACATCCAGATGACGCAGAGCCCCGTCTACCCTGTCCGCCTCCGTGAGAGATCGCGTGATCATCA
CCTGTCCGGGCCAGCCAGTCCATCGGAAACCGCTTGGCGTGGTACCAGCACAAAGCCTGGGAAGG
CTCCGAAGCTGCTCATCTACGAAGCCTCGACTTCGGAGACTGGTGTCCCTAGCCGGTTCAGCGG
ATCGGGATCAGGGACCGATTTCACTCTGACCATTTCTCCCTGCAACCCGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCCAACAGTCATATTCCACCCCGTACACCTTCGGACAAGGCACCAAGCTCGAAATCAA
25 G

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb G1-AA/E12v2 (con LALA) (SEQ ID NO: 16)

Dominio VH (cursiva); CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada); mutación LALA (negrita y subrayada)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTIFGVSYYYYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
 PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
 CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mAb G1-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 17)

Dominio VH (cursiva); CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRASQSIGNRLAWYQHKPGKAPKLLIYEASTSETGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

5

Secuencias de aminoácidos de CDR del mAb E05v2 (Kabat)

CDR1 de VH - SYGIS (SEQ ID NO: 1)

CDR2 de VH - WISAYSGGTNYAQKLQG (SEQ ID NO: 2)

CDR3 de VH - DLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: 3)

10 CDR1 de VL - RASQSIGRLA (SEQ ID NO: 18)

CDR2 de VL - EASNLES (SEQ ID NO: 19)

CDR3 de VL - QQSYSTPRVT (SEQ ID NO: 20)

Secuencias de aminoácidos de CDR de E05v2 (IMGT)

CDR1 de VH - GYTFTSYG (SEQ ID NO: 21)

15 CDR2 de VH - ISAYSGGT (SEQ ID NO: 8)

CDR3 de VH - ARDLFTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: 9)

CDR1 de VL - QSISGR (SEQ ID NO: 22)

CDR2 de VL - EAS (SEQ ID NO: 11)

CDR3 de VL - QQSYSTPRVT (SEQ ID NO: 20)

20 Secuencia de aminoácidos del dominio VH del mAb E05v2 (SEQ ID NO: 23)

CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTIFGVSYYYYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico del dominio VH del mAb E05v2 (SEQ ID NO: 24)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
 TGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
 AAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAACTACGCTCAAAAGC
 TGCAGGGTGCAGTACCATGACCAACGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAAGTGAATC
 TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCACTATCTTCGGA
 GTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTGCGAGC

25 Secuencia de aminoácidos del dominio VL del mAb E05v2 (SEQ ID NO: 25)

CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSIGRLAWYQQKPGKAPNLLIYEASNLES
GTEFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPRVTFGQGTKVEIK

Secuencia de ácido nucleico del dominio VL del mAb E05v2 (SEQ ID NO: 26)

GACATTCAGATGACCCCAATCCCCGCTCCACGCTGAGCGCCTCCGTCGGTGATCGCGTGACAATCA
CTTGTCGGGGCGTCGCAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGG
CTCCCAACCTCCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGAGTGCCCTAGCCGGTTCAGCGG
ATCAGGGTCCGGTACCGAGTTCACCCCTGACCATTCTCTCGCTCCAACCTGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCCAACAGTCTATTCAACTCCGCGCGTGACCTTCGGCCAGGGCACTAAGGTGAAA
TCAAA

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb G1-AA/E05v2 (con LALA) (SEQ ID NO: 27)

5 Dominio VH (cursiva); CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada); mutación LALA (negrita y subrayada)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTIFGVSYYYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CIVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHENHHTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mAb G1-AA/E05v2 y mAb² FS22-172-003-AA/E05v2 y FS22-053-008-AA/E05v2 (SEQ ID NO: 28)

Dominio VH (cursiva); CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSSISGRLLAWYQOKPGKAPNLLIYEASNLESGLVPSRFSGSGS
GTEFTLTISLQPEDFATYYCQGSYSTPRVTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
LNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

Secuencias de aminoácidos de CDR del mAb G12v2 (Kabat)

CDR1 de VH - SYGIS (SEQ ID NO: 1)

CDR2 de VH - WISAYSGGTNYAQKLQG (SEQ ID NO: 2)

CDR3 de VH - DLFPTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: 3)

15 CDR1 de VL - RASQSSISGRLLA (SEQ ID NO: 18)

CDR2 de VL - EASNLES (SEQ ID NO: 19)

CDR3 de VL - QQSYSWPRT (SEQ ID NO: 29)

Secuencias de aminoácidos de CDR de G12v2 (IMGT)

CDR1 de VH - GYTFTSYG (SEQ ID NO: 21)

20 CDR2 de VH - ISAYSGGT (SEQ ID NO: 8)

CDR3 de VH - ARDLFTIFGVSYYYY (SEQ ID NO: 9)

CDR1 de VL - QSISGR (SEQ ID NO: 22)

CDR2 de VL - EAS (SEQ ID NO: 11)

CDR3 de VL - QQSYSWPRT (SEQ ID NO: 29)

25 Secuencia de aminoácidos del dominio VH del mAb G12v2 (SEQ ID NO: 23)

CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTIFGVSYYYWGQGLTVTVSS

Secuencia de ácido nucleico del dominio VH del mAb G12v2 (SEQ ID NO: 24)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
TGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
AAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAACTACGCTCAAAAGC
TGCAGGGTCCGCTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAAGTGAATC
TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCACTATCTTCGGA
GTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTGCGAGC

Secuencia de aminoácidos del dominio VL del mAb G12v2 (SEQ ID NO: 30)

- 5 CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

*DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQ**SI**SGRLAWYQQKPGKAPNLLI**YEAS**NLESGVPSRFSGSGS*
*GTEFTLTISLQPEDFATYYC**QQSY**SWPRTFGQGTKVEIK*

Secuencia de ácido nucleico del dominio VL del mAb G12v2 (SEQ ID NO: 31)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGTCCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGACCATC
ACTTGCCGCGCCTCACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAG
GCCCCAAACCTTCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGCGTCCCTTCGCGGTTCTCTG
GCTCCGGTTCGGAACTGAGTTCACCCCTACCATCTCGTCCCTGCAACCGGAAGATTTCGCCAC
CTACTACTGCCAACAGTCGTACTCCTGGCCCCGACATTCGGACAGGGAACCAAGTCGAGATT
AAG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb G1-AA/G12v2 (con LALA) (SEQ ID NO: 27)

- 10 Dominio VH (cursiva); CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada); mutación LALA (negrita y subrayada)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKV**SC**KASGY**TFTSY**GISWVRQAPGQGLEWMGW**ISAYS**GGTNYAQK**LQ***
*GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC**ARDLFPTIFGV**SYYYWGQGT***L***TVSSASTKGPSVF*
*PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS***SSL**
*GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT*
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSN
*KALPAPIEKTI**SKAKGQ**PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT*
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mAb G1-AA/G12v2 y mAb² FS22-172-003-AA/G12v2 y FS22-053-008-AA/G12v2 (SEQ ID NO: 33)

- 15 Dominio VH (cursiva); CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

*DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQ**SI**SGRLAWYQQKPGKAPNLLI**YEAS**NLESGVPSRFSGSGS*
*GTEFTLTISLQPEDFATYYC**QQSY**SWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV***VCL**
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

Secuencias de aminoácidos de CDR del mAb lambdav3/lam-G02v3 (Kabat)

CDR1 de VH - SYGIS (SEQ ID NO: 1)

CDR2 de VH - WISAYSGGTNYAQK**LQ**G (SEQ ID NO: 2)

- 20 CDR3 de VH - DLFPTIFGVSYYY**Y** (SEQ ID NO: 3)

CDR1 de VL - TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO: 34)

CDR2 de VL - EVTNRPS (SEQ ID NO: 35)

CDR3 de VL - SSFKRGSTLVV (SEQ ID NO: 36)

Secuencias de aminoácidos de CDR de lambdav3/lam-G02v3 (IMGT)

- 25 CDR1 de VH - GYTFTSYG (SEQ ID NO: 21)

CDR2 de VH - ISAYSGGT (SEQ ID NO: 8)

CDR3 de VH - ARDLFTIFGVSYYYYY (SEQ ID NO: 9)

CDR1 de VL - SSDVGGYNY (SEQ ID NO: 37)

CDR2 de VL - EVT (SEQ ID NO: 38)

CDR3 de VL - SSFKRGSTLVV (SEQ ID NO: 36)

5 Secuencia de aminoácidos del dominio VH del mAb lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: 23)

CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGGGLEWMGWISAYS****GGTNYAQKLO***
*GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDL****FPTIFGVSYYYYYWGQGLTVTVSS***

Secuencia de ácido nucleico del dominio VH del mAb lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: 24)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
TGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
AAGGCTTGGAGTGGATGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAACTACGCTCAAAAGC
TGCAGGGTGGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAAGTGAATC
TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCCGGGACCTGTTCCCCACTATCTTCGGA
GTGTCTACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTGCGAGC

10 Secuencia de aminoácidos del dominio VL del mAb lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: 41)

CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQFPGKAPKLMIFEVTNRPSGVSDRFSGS
KSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCSSFKRGSTLVVFGGGTKLTVL

Secuencia de ácido nucleico del dominio VL del mAb lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: 42)

CAGTCCGGCCCTTACTCAACCCGCGTCAGTCTCCGGTAGCCCCGGACAGTCCATCACGATTTCCGT
GCACCGGAACAGCAGCGATGTCGGGGGATACAACACTACGTGTCCTGGTACCAGCAGTTCCCGG
GAAAGGCCCTAAGCTGATGATCTTCGAAGTCACTAACAGACCTTCCGGAGTGTCCGACCGGTT
CTCCGGCTCCAAGTCCGACAACACTGCGAGCCTGACCATCTCCGGCCTGCAAGCCGAGGACGA
AGCCGAGTACTACTGTAGCTCATTCAAGCGCGGTTCCACCCTCGTGGTGTTCGGCGGTGGCACT
AAGCTCACCGTGTCTGGGA

15 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb G1-AA/lambdav3/lam-G02v3 (con LALA) (SEQ ID NO: 27)

Dominio VH (cursiva); CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada); mutación LALA (negrita y subrayada)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGGGLEWMGWISAYS****GGTNYAQKLO***
*GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDL****FPTIFGVSYYYYYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF***
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
*GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPE****AA****GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT*
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mAb G1-AA/lambdav3/lam-G02v3 (SEQ ID NO: 44)

20 Dominio VL (cursiva); CDR de IMGT (negrita y cursiva); CDR de Kabat (cursiva y subrayada)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQFPGKAPKLMIFEVTNRPSGVSDRFSGS
KSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCSSFKRGSTLVVFGGGTKLTVLGQPAAPSVTLFPPSSEELQANKA
TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH
EGSTVEKTVAPTECS

Definición alternativa de HCDR1 (IMGT) (SEQ ID NO: 45)

GYX₁FTSYG

donde X₁ es P o T

Definición alternativa de LCDR1 (Kabat) (SEQ ID NO: 46)

5 RASQSIX₂X₃RLA

donde X₂ es S o G, X₃ es N o G

Definición alternativa de LCDR2 (Kabat) (SEQ ID NO: 47)

EASX₄X₅EX₆

Donde X₄ es T o N; X₅ es S o L; X₆ es T o S

10 Definición alternativa de LCDR3 (Kabat) (SEQ ID NO: 48)

QSYSX₇PX₈X₉T

Donde X₇ es T o W; X₈ está ausente o R; X₉ es Y, R o V

Definición alternativa de LCDR1 (IMGT) (SEQ ID NO: 49)

QSIX₁₀X₁₁R

15 Donde X₁₀ es G o S; X₁₁ es N o G

Definición alternativa de LCDR3 (IMGT) (SEQ ID NO: 50)

QSYSX₁₂X₁₃X₁₄X₁₅T

Donde X₁₂ está ausente o T; X₁₃ es T, W o P; X₁₄ es P o R; X₁₅ es Y o R

Secuencias de aminoácidos de HFW de IgG1 (Kabat)

20 HFW1 - EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYX₁₆FT (SEQ ID NO: 51)

Donde X₁₆ es P o T

HFW2 - WVRQAPGQGLEWMG (SEQ ID NO: 52)

HFW3 - RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 53)

HFW4 - WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 54)

25 Secuencias de aminoácidos de HFW de IgG1 (IMGT)

HFW1 - EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKAS (SEQ ID NO: 55)

HFW2 - ISWVRQAPGQGLEWMGW (SEQ ID NO: 56)

HFW3 - NYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYC (SEQ ID NO: 57)

HFW4 - WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 54)

30 Secuencias de aminoácidos de LFW de la cadena ligera kappa (Kabat)

LFW1 - DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITC (SEQ ID NO: 58)

LFW2 - WYQHKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 59)

LFW3 - GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 60)

LFW4 - FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 61)

35 Secuencias de aminoácidos de LFW de la cadena ligera kappa (IMGT)

LFW1 - DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRAS (SEQ ID NO: 62)

LFW2 - LAWYQHKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 63)

LFW3 - TSETGVPSRFGSGSGDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: **64**)

LFW4 - FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: **61**)

Secuencias de aminoácidos de LFW de la cadena ligera lambda (Kabat)

LFW1 - QSALTQPASVSGSPGQSITISC (SEQ ID NO: **65**)

5 LFW2 - WYQQFPGKAPKLMIF (SEQ ID NO: **66**)

LFW3 - GVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYC (SEQ ID NO: **67**)

LFW4 - FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: **68**)

Secuencias de aminoácidos de LFW de la cadena ligera lambda (IMGT)

LFW1 - QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGT (SEQ ID NO: **69**)

10 LFW2 - VSWYQQFPGKAPKLMIF (SEQ ID NO: **70**)

LFW3 - NRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEAEYYC (SEQ ID NO: **71**)

LFW4 - FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: **68**)

Secuencias de aminoácidos de bucles estructurales del dominio CH3 WT

Bucle AB WT - RDELTKNQ (SEQ ID NO: **72**)

15 Bucle CD WT - SNGQPENNY (SEQ ID NO: **73**)

Bucle EF WT - DKSRWQQGNV (SEQ ID NO: **74**)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 WT (SEQ ID NO: **75**)

Los bucles AB, CD y EF están subrayados

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20 Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 (SEQ ID NO: **76**)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 con mutación LALA (SEQ ID NO: **77**)

Mutación LALA subrayada

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

25 Secuencia de aminoácidos del dominio CH2 con mutación LALA y mutación P114A (SEQ ID NO: **176**)

Mutación LALA subrayada; mutación P114A en negrita y subrayada

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL**A**PIEKTISKAK

Secuencia de aminoácidos del resto PPY (SEQ ID NO: **78**)

PPY

30 Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 de FS22-053-008

Primera secuencia de FS22-053-008 - NPPYLFS (SEQ ID NO: **79**)

Segunda secuencia de FS22-053-008 - DYWRWLE (SEQ ID NO: **80**)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de FS22-053-008 (SEQ ID NO: **81**)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 de FS22-053-008 (SEQ ID NO: 82)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTACTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGCTGGAAGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTG
TCCCTGTGCCCCGGT

5 Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 de FS22-053-009

Primera secuencia de FS22-053-009 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda secuencia de FS22-053-009 - EHTRWLD (SEQ ID NO: 83)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 de FS22-053-009 (SEQ ID NO: 84)

Primera y segunda secuencias subrayadas

10 GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVEHTRWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 de FS22-053-009 (SEQ ID NO: 85)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACTACTAGGTGGCTGGATGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-053-011

Primera secuencia de FS22-053-011 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

15 Segunda secuencia de FS22-053-011 - DYWRWTD (SEQ ID NO: 86)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-053-011 (SEQ ID NO: 87)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDYWRWTDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053-011 (SEQ ID NO: 88)

20 GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACTGGAGGTGGACTGATGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-053-017

Primera secuencia de FS22-053-017 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda secuencia de FS22-053-017 - YHWRWLE (SEQ ID NO: 89)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-053-017 (SEQ ID NO: 90)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053-017 (SEQ ID NO: 91)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCCTTCACGCGACGAACTCAATCCGCCCT
ACCTGTTCTCCAACCAAGTCTCCCTGACCTGTCTTGTGAAGGGTTTCTACCCATCCGATATCGCC
5 GTGGAGTGGGAGAGCAACGGACAGCCGGAGAACAATAAGACTACCCCGCCTGTGCTGGAC
TCGGACGGCAGCTTCTTCTTGTACTCCAACTGACCGTGTACCACTGGCGGTGGCTGGAAGGGA
ACGTGTTTAGCTGCTCCGTCATGCATGAAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTCTC
GCTCTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-053-014

Primera secuencia de FS22-053-014 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda secuencia de FS22-053-014 - YHWRWLD (SEQ ID NO: 92)

10 Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-053-014 (SEQ ID NO: 93)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVYHWRWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053-014 (SEQ ID NO: 94)

GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGTACCACTGGAGGTGGCTGGATGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTG
TCCCTGTGCGCCCGGA

15 Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-053-010

Primera secuencia de FS22-053-010 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda secuencia de FS22-053-010 - DYMRWLD (SEQ ID NO: 95)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-053-010 (SEQ ID NO: 96)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
20 SFFLYSKLTVDYMRWLDGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053-010 (SEQ ID NO: 97)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACATGAGGTGGCTGGATGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-053-012

Primera secuencia de FS22-053-012 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

25 Segunda secuencia de FS22-053-012 - DHMRWLE (SEQ ID NO: 98)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-053-012 (SEQ ID NO: 99)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDHMRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053-012 (SEQ ID NO: 100)

5 GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGATCATATGAGGTGGCTGGAAGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-053-013

Primera secuencia de FS22-053-013 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda secuencia de FS22-053-013 - GYERWLE (SEQ ID NO: 101)

10 Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-053-013 (SEQ ID NO: 102)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVGYERWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053-013 (SEQ ID NO: 103)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGGTTACGAAAGGTGGCTGGAAGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

15 Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-053-015

Primera secuencia de FS22-053-015 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda secuencia de FS22-053-015 - DHWRWLQ (SEQ ID NO: 104)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-053-015 (SEQ ID NO: 105)

Primera y segunda secuencias subrayadas

20 GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDHWRWLQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053-015 (SEQ ID NO: 106)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGATCATTGGAGGTGGCTGCAGGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-053-016

Primera secuencia de FS22-053-016 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

25 Segunda secuencia de FS22-053-016 - DYIRWLN (SEQ ID NO: 107)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-053-016 (SEQ ID NO: 108)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVDYIRWLNQVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053-016 (SEQ ID NO: 109)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATTACATCAGGTGGCTGAACGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

5

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 de FS22-053

Primera secuencia de FS22-053-008 - NPPYLFS (SEQ ID NO: 79)

Segunda secuencia de FS22-053-008 - YYNRWQD (SEQ ID NO: 110)

Secuencias de aminoácidos del dominio CH3 de FS22-053 (SEQ ID NO: 111)

10 Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
SFFLYSKLTVYYNRWQDGNVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-053 (SEQ ID NO: 112)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACCCGCCG
TACCTGTTCTCTAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGTATTATAACAGGTGGCAGGATGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTC
TCCCTGTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-172-003

15 Primera secuencia de FS22-172-003 - PYIIPPY (SEQ ID NO: 113)

Segunda secuencia de FS22-172-003 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-172-003 (SEQ ID NO: 115)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELPIIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD
FFLYSKLTVGADRWLEGNVNFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20 Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-172-003 (SEQ ID NO: 116)

GGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATACATC
ATCCCACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTT
GTCCCTGTGCGCCGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-172-002

Primera secuencia de FS22-172-002 - PFQMPPY (SEQ ID NO: 117)

Segunda secuencia de FS22-172-002 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

25

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-172-002 (SEQ ID NO: 118)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELPFQMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
GSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-172-002 (SEQ ID NO: 119)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATTCCAG
ATGCCACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGT

5

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-172-004

Primera secuencia de FS22-172-004 - NYIYPPY (SEQ ID NO: 120)

Segunda secuencia de FS22-172-004 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-172-004 (SEQ ID NO: 121)

10 Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELNYIYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
GSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-172-004 (SEQ ID NO: 122)

GGACAGCCTCGAGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAACTACATCT
ACCCACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA
CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAGG
GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCACTACACTCAGAAGAGCTTG
TCCCTGTGCGCCCGGA

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-172-001

15 Primera secuencia de FS22-172-001 - PFVMPPY (SEQ ID NO: 123)

Segunda secuencia de FS22-172-001 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-172-001 (SEQ ID NO: 124)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELPFVMPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
GSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

20 Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-172-001 (SEQ ID NO: 125)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCCATTTCGTT
ATGCCACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-172-005

Primera secuencia de FS22-172-005 - QQVYPPY (SEQ ID NO: 126)

Segunda secuencia de FS22-172-005 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

25

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-172-005 (SEQ ID NO: 127)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELQQVYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-172-005 (SEQ ID NO: 128)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCAGCAGGTT
TACCCACCATAACAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACCGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGCTGGAAG
GGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGT

5

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-172-006

Primera secuencia de FS22-172-006 - RKYYPPY (SEQ ID NO: 129)

Segunda secuencia de FS22-172-006 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-172-006 (SEQ ID NO: 130)

10 Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELRKYYPPYNQLSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-172-006 (SEQ ID NO: 131)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATAC
TACCCGCCGTACAACCAGCTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAG
GGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGT

Secuencias de aminoácidos de secuencias de bucles estructurales del dominio CH3 del Fcab FS22-172

15 Primera secuencia de FS22-172 - RKYYPPY (SEQ ID NO: 129)

Segunda secuencia de FS22-172 - GADRWLE (SEQ ID NO: 114)

Secuencia de aminoácidos del dominio CH3 del Fcab FS22-172 (SEQ ID NO: 132)

Primera y segunda secuencias subrayadas

GQPREPQVYTLPPSRDELRKYYPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
GSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20 Secuencia de ácido nucleico del dominio CH3 del Fcab FS22-172 (SEQ ID NO: 133)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGCGTAAATAC
TACCCGCCGTACAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG
ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGCGCAGATAGGTGGCTGGAAG
GGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCCGGGT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 134)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCASGYPF^TSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFP^TIFGVSYYYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVGADRWLEGNVFSCSVMH^EALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 135)

GAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTAAAAGACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCT
GCAAGGCTTCTGGCTACCCCTTTACCTCCTACGGCATCTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACA
AGGCTTGGAATGGATGGGCTGGATCTCCGCTTATCCGGCGGCACCAATTACGCCAGAACTG
CAGGGCAGAGTGACCATGACACCGACACCTCTACCTCCACCGCCTACATGGAAGTGCAGTCC
CTGAGATCTGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGATCTGTTCCCCACCATCTTCGGCG
TGTCTACTACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCTGCTTCTACCAAGGG
ACCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGC
TGCTTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAAGTCTGGCGCTCTGACAT
CTGGCGTGCACACCTTTCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCTGTCTCTGTCTGTCTGT
GACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCC
AACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCAT
GTCTGTCTCCAGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACAC
CCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGACCCA
GAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGA
GAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGATTGGC
TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGAC
CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCTCCATCTCGGGAC
GAGCTGCCCTACATCATCCCTCCATACAACAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCT
ACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAAC
CCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGGCGCCGAC
AGATGGCTGGAAGGGAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACA
CACAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGC

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 y FS22-053-008-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 17)

DIQMTQSPSTLSASVRDRVIITCRASQSIGNRLAWYQHKGKAPKLLIYEASTSETGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPYTFGGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHOGLSS
PVTKSFNRGEC

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera del mAb² FS22-172-003-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 136)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACACTGTCCGCCCTCTGTGCGGGACAGAGTGATCATCA
CCTGTAGAGCCAGCCAGTCCATCGGCAACAGACTGGCCTGGTATCAGCACAAAGCCTGGCAAGG
CTCCCAAGCTGCTGATCTACGAGGCCCTCCACATCTGAGACAGGCGTGGCCTCTAGATTCTCCGG
CTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCTTGACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCCAGCAGTCTTACAGCACCCCTTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCA
AGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCG
GCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTACCCCAAGGAGGCGCAAGGTGCAGTGG
AGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCAACCGAGCAGGACAGCAAG
GACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG
GTGTACCGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCCTGACCAAGAGCTTCAACAGG
GGCGAGTGC

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del mAb² FS22-172-003-AA/E05v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 137)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPITFGVSYYYWGGGLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIYIPPNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG*

5 Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del mAb² FS22-172-003-AA/E05v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 138)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
TGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
AAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAACTACGCTCAAAAGC
TGCAGGCTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAAGTGAAGTC
TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCACTATCTTCGGA
GTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAG
GGCCCGTCCGGTGTTCGGCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTG
GGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGA
CCTCCGGAGTGCATACCTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCCGTG
GTCACCGTCCCTTCGTCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTC
GAACACCAAGGTCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCC
TTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCTTCCGTGTTCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAGGA
TACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGA
CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCCA
CGGGAAGAAGAGTACAAGTCACTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACT
GGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGA
AAACTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCC
GGATGAGCTGCCATACATCATCCACCATACAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCGAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAGTACAAG
ACCACGCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGGC
CAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCA
CTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCCCCGGT

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera del mAb² FS22-172-003-AA/E05v2 (SEQ ID NO: 139)

GACATTCAGATGACCCAATCCCCGTCCACGCTGAGCGCCTCCGTCCGTGATCGCGTGACAATCA
CTTGTCGGGCGTCGCAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGG
CTCCCAACCTCCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCGGAGTGCCTAGCCGGTTCAGCGG
ATCAGGGTCCCGTACCGAGTTCACCCGTGACCATTTCTCGCTCCAACCTGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCCAACAGTCTATTCAACTCCGCGCGTGACCTTCGGCCAGGGCACTAAGGTGCAAA
TCAAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCGGTGTTTATCTTCCCGCCCTCGGACGAACAGCTGAAGTC
AGGCACTGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGG
AAGGTGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAG
GATTCCACTTATTCCCTGTCTCCACCCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGT
GTACGCCTGCGAAGTGACCCATCAAGGGCTTTCGTGCGCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG
CGAATGC

10 Secuencia de aminoácidos (AA) de la cadena pesada del mAb² FS22-172-003-AA/G12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 140)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPITFGVSYYYWGGGLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIYPYINQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del mAb² FS22-172-003-AA/G12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 141)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
TGCAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
AAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAACTACGCTCAAAAGC
TGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAAGTGAATC
TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCCACTATCTTCGGA
GTGTCTGACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAG
GGCCCCGTGGTGTTCCTCGTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTG
GGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGA
CCTCCGGAGTGCATACCTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCTCGTG
GTCACCGTCCCTTCGTCTCTCCGTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTC
GAACACCAAGGTCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCTGCGACAAGACTCACACTTGCCCCGCC
TTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCTTCCGTGTTCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAGGA
TACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGA
CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCA
CGGGAAGAAGAGTACAACCTCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACT
GGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAGTGTCACAACAGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGA
AAACTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCCG
GGATGAGCTGCCATACATCATCCCACCATAACAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAG
ACCACGCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGGGC
CAGATAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACCA
CTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCCCCGGT

5 Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera del mAb² FS22-172-003-AA/G12v2 (SEQ ID NO: 142)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCACGCTGTCCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGACCATC
ACTTGCCGCGCCTCACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCCGGAAG
GCCCCAAACCTTCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGCGTCCCTTCGCGGTTCTCTG
GCTCCGGTTCGGAACTGAGTTACCCCTACCATCTCGTCCCTGCAACCGGAAGATTTGCCAC
CTACTACTGCCAACAGTCTGACTCCTGGCCCCGACATTCCGACAGGGAACCAAAGTCGAGATT
AAGCGGACTGTGGCGGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCCCCGTCCGACGAACAGCTGAAGTCCG
GTACCGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGAA
GGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGA
TTCCACTTATTCCCTGTCTCCACCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGT
ACGCCTGCGAAGTGACCCATCAAGGGCTTTCGTGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCG
AATGC

Secuencia de AA de la cadena pesada del mAb² FS22-053-008-AA/E12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 143)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPITFGVSYYYWGGGLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del mAb² FS22-053-008-AA/E12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 144)

GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
TGCAAAGCCTCAGGATACCCCTTCACTTCGTACGGGATTTCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
AAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCACTACGCTCAAAAGC
TGCAGGGTCGCGTGACCATGACCACCGATACCTCCACCTCAACGGCCTACATGGAAGTGAAGTC
TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCACTATCTTCGGA
GTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAG
GGCCCGTCGGTGTTCGGCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTG
GGCTGCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGTGTCTTGAACAGCGGAGCCCTGA
CCTCCGGAGTGCATACTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCCGTG
GTCACCGTCCCTTCGTCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTC
GAACACCAAGGTCGACAAGAAGGTCGAGCCGAAGTCGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCC
TTGCCAGCCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCTTCCGTGTTCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAGGA
TACCCTGATGATCTCACGGACCCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGA
CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCA
CGGGAAGAACAGTACAACCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACT
GGCTGAACGGGAAGGAGTACAAGTGCAAGTGTCCAACAAGGCGCTGCCTGCCCAATTGAGA
AACTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG
GGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTTAACAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAG
ACCACGCCCTCCCGTACTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGATT
ACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACC
ACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCCCCGGT

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera del mAb² FS22-053-008-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 145)

GACATCCAGATGACGCAGAGCCCCGTCTACCCTGTCCGCTCCGTGAGAGATCGCGTGATCATCA
CCTGTGCGGGCCAGCCAGTCCATCGGAAACCGCTTGGCGTGGTACCAGCACAAAGCCTGGGAAGG
CTCCGAAGCTGCTCATCTACGAAGCCTCGACTTCGAGAGTGGTGTCCCTAGCCGGTTCAGCGG
ATCGGGATCAGGGACCGATTTCACTCTGACCATTTCTCCCTGCAACCCGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCCAACAGTCATATTCCACCCCGTACACCTTCGACAAGGCACCAAGCTCGAAATCAA
GCGGACTGTGCGCGCACCTTCCGTGTTCAATTTCCACCCCTCCGACGAACAGCTGAAATCGGGT
ACAGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAAGG
TCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATT
CCACTTATTCCCTGTCTCCACCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTAC
GCCTGCGAAGTGACCCATCAAGGGCTTTCGTGCGCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAA
TGC

5

Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22-053-008-AA/E05v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 146)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

*EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTIFGVSYYYWGQGLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG*

Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del mAb² FS22-053-008-AA/E05v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 147)

GAAAGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
TGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCCCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
AAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAACTACGCTCAAAAGC
TGCASGGTCCCGTGACCATGACCACCGATACCTCCAGCTCAACGGCCTACATGGAAGTGAATC
TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCGGGACCTGTTCCCACTATCTTCGGA
GTGTCGTACTACTACTACTGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTGAGCGCTAGCACTAAG
GGCCCGTCCGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCGCCCTG
GGCTGCCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGA
CCTCCGGAGTGCATACCTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCCTCTGGCCTGTACTCATTGTCTCCGTG
GTCAACCGTCCCTTCCGTCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAATGTCAACCATAAGCCCTC
GAACACCAAGGTGACAAAGAAGGTGAGGCCGAAGTCTGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCC
TTGCCAGCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCTTCGGTGTCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAGGA
TACCCTGATGATCTCAGCGACCCCGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACAGGGA
CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGGCCA
CGGGAAGAAGAGTACAACCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACT
GGCTGAACCGGAAGGAGTACAAGTGCAAGTGTCCAACAAGGCCGTGCCTGCCCAATTGAGA
AAACTATCTCGAAAGCCAAGGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCG
GGATGAGCTGAACCCCGCGTACCTGTTCTTAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAAGC
TTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG
ACCACGCCCTCCCGTACTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAACGTGGATT
ACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCGCTGCACAACC
ACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTGCCCGGT

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera del mAb² FS22-053-008-AA/E05v2 (SEQ ID NO: 148)

GACATTCAGATGACCCCAATCCCCCTCCACCGCTGAGCGCCTCCGTCCGGTGATCGCGTGACAATCA
CTTGTCCGGCGTCCGAGTCCATCTCTGGAAGGCTCGCCTGGTACCAAGCAGAAGCCTGGAAAGG
CTCCCAACCTCCTTATCTACGAAGCCAGCAACCTGGAGTCCCGAGTGCCTAGCCGGTTCCAGCGG
ATCAGGGTCCCGTACCGAGTTCACCCCTGACCATTTCCCTCGCTCCAACCTGAGGACTTCGCCACC
TACTACTGCCAACAGTCTTATTCAACTCCCGCGGTGACCTTCGCCCAAGGCACTAAGGTGCAAA
TCAAAAGAACCGTGGCAGCCCCATCGGTGTTTATCTTCCCGCCCTCGGACGAACAGCTGAAGTC
AGGCACTGCTAGCCTGGTCTGTCTCCTGAACAATTTGTACCCGCCCGAAGCTAAGGTCCAGTGG
AAGGTGACAAACCGCTGCAGTCCGGAACAGCCAGGAGTCAAGTACCGAGCAGGACTCCAAG
GATTCCACTTATTCCCTGTCTCCACCCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGT
GTACGCCCTGCCAAGTGACCCATCAAGGGCTTTCTGTGCCCGGTGACCAAGAGCTTCAACCCGGG
CGAATGC

5

Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22-053-008-AA/G12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 149)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFPITFGVSYYYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
*GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPE****AA****GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT*
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDYWRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada del mAb² FS22-053-008-AA/G12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 150)

GAAAGTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTCAAGAGGSCCTGGAGCGTCCGTGAAGGTGTCC
TGCAAAGCCTCAGGATACACCTTCACTTCGTACGGGATTTCCTGGGTCCGCCAAGCACCGGGTC
AAGGCTTGGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCGTATTCCGGGGGAACCAACTACGCTCAAAAGC
TGCAGGGTGGCGTGACCATGACACCGATACCTCCACCTCAACGGCTACATGGAACTGAGATC
TCTGCGGAGCGACGACACTGCCGTGTACTACTGTGCCCCGGGACCTGTTCCCCACTATCTTCGGA
GTGTGCTACTACTACTACTGGGGGCCAGGGGACTCTCGTGACCGTGTGGAGCGCTAGCACTAAG
GGCCCGTCCGTGTTCCCGCTGGCCCCATCGTCCAAGAGCACATCAGGGGGTACCGCCCGCCCTG
GGCTGCCCTTGTGAAGGATTACTTTCCCGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGA
CCTCCGGAGTGCATACCTTTCCCGGCTGTGCTTCAGTCCCTCTGGCCCTGTACTCATTGTCTCCGTG
GTACCCGTCCCTTCGTCTCCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGTAAATGTCAACCATAAGCCCTC
GAACACCAAGGTGACAAAGAAGGTGAGCCGAAGTGGTGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCC
TTGCCCGAGCCCGGAAGCTGCCGGTGGTCTTCCGTGTTCTCTTCCCGCCCAAGCCGAAGGA
TACCCGTGATGATCTCACGGACCCCGGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCACAGGGA
CCCGGAAGTGAAATTCAATTGGTACGTGGATGGAGTGGAAAGTGACAAACGCCAAGACCAAGCCA
CGGGAAGAAGTACAACCTACCTACCGCGTGGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAAGACT
GGCTGAACCGGAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCGCTGCCCTGCCCAATTGAGA
AAACTATCTCGAAAGCCAAAGGACAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCC
GGATGAGCTGAACCCGCCGTACCTGTTCTCTAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAAGC
TTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGGAGAACAACACTACAAG
ACCAAGCCTCCCGTACTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGATT
ACTGGAGGTGGCTGGAAGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAAGGCGCTGCACAACC
ACTACACTCAGAAGAGCTTGTCCCTGTCCGCCGT

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera del mAb² FS22-053-008-AA/G12v2 (SEQ ID NO: 151)

GACATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCAGCTGTCCGCAAGCGTGGGGGACAGAGTGACCATC
ACTTGCCGCGCCTCACAATCCATCAGCGGACGCTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAG
GCCCCAAACCTTCTGATCTACGAAGCCTCGAACCTGGAGTCAGGCGTCCCTTCGCGGTTCTCTG
GCTCCGGTTCGGGAAGTGAAGTACCCCTACCATCTCGTCCCTGCAACCGGAAGATTTGCCAC
CTACTACTGCCAACAGTCTGACTCCTGGCCCCGACATTCGGACAGGGAACCAAGTCTGAGATT
AAGCGGACTGTGGCGGCTCCTAGCGTGTTCATCTTTCCCCCGTCCGACGAACAGCTGAAGTCCG
GTACCGCTAGCGTGGTCTGTCTCCTGAACAATTTCTACCCGCGCGAAGCTAAGGTCCAGTGGAA
GGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAACAGCCAGGAGTCAGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGA
TTCCACTTATTCCCTGTCTCCACCCTGACTTTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGT
ACGCCCTGCGAAGTGACCCATCAAGGGCTTTCTGTCGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCG
AATGC

5

Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22-053-017AA/E12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 152)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en **negrita**)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCA**SG**YPFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQKLQ
GRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDTAVYYCARDL**FPTIF**GVSYYYWGGTLTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPE**AA**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CWWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPLYFSNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVYHWRWLEGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22-053-017AA/E05v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 153)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTTIFGVSYYYWGGGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRLLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22-053-017AA/G12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 154)

- 5 Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTTIFGVSYYYWGGGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRLLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22-172-003AA/lam-G02v3 con mutación LALA (SEQ ID NO: 155)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYSGGTNYAQLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTTIFGVSYYYWGGGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRLLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

- 10 Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22-172-003AA/S70 con mutación LALA (SEQ ID NO: 156)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELNPPYLFNSQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVYHWRLLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de AA de la cadena ligera de S70 (SEQ ID NO: 157)

Dominio VL (cursiva);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQKPGKAPKLLIYSASFVLYSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQLYHPATFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

- 15

Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22-172-003AA/HeID1.3 con mutación LALA (SEQ ID NO: 158)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

QVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKS
RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSGLVTSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELPIIPPYNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVGADRWLEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de AA de la cadena ligera de HeID1.3 (SEQ ID NO: 159)

5 Dominio VL (cursiva)

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGSGS
GTQYSLKINSIQPEDFGSYQCQHFWSPTRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22m-063AA/S70 con mutación LALA (SEQ ID NO: 160)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEPYWYSYVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
VLDSDGDSFFLYSKLTMVNYRWELGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

10 Secuencia de AA de la cadena pesada de FS22m-063AA/HeID1.3 con mutación LALA (SEQ ID NO: 161)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

QVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKS
RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSGLVTSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEPYWYSYVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLD
SDGDSFFLYSKLTMVNYRWELGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de AA de la cadena pesada de G1-AA/E12v2 con mutación LALA (SEQ ID NO: 162)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

EVQLVQSGAEVKRPGASVKVSCKASGYPTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISA YSGGTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDLFTIFGVSYYYWGGGLVTSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
15 CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Secuencia de AA de la cadena pesada de G1/S70 (SEQ ID NO: 163)

Dominio VH (cursiva)

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Secuencia de AA de la cadena pesada de G1-AA/S70 con mutación LALA (SEQ ID NO: 164)

- 5 Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVK
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Secuencia de AA de la cadena pesada de G1/4420 (SEQ ID NO: 165)

Dominio VH (cursiva)

*EVKLDETGGGLVQPGPRMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

- 10 Secuencia de AA de la cadena ligera de 4420 (SEQ ID NO: 166)

Dominio VL (cursiva)

*DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSINRFSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSSTHVPWTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC*

Secuencia de AA de la cadena pesada de G1-AA/4420 con mutación LALA (SEQ ID NO: 167)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

*EVKLDETGGGLVQPGPRMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDS
VKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAP
SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDS*
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 15

Secuencia de AA de la cadena pesada de G1-AA/HeID1.3 con mutación LALA (SEQ ID NO: 168)

Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

*QVQLQESGPGGLVLRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKS
RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGSGLTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Secuencia de AA de la cadena pesada de G1-AA/MLS109 con mutación LALA (SEQ ID NO: 169)

- 5 Dominio VH (cursiva); mutación LALA (subrayado en negrita)

*EEQVLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSPYSVFWVRQAPGKGLEWVSSINSDSTYKYADSVKG
RFTISRDNAENSIFLQMNSLRADTAVYYCARDRSYAFSSGSLSDYGYGLDVWGQGTIVVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de MLS109 (SEQ ID NO: 170)

Dominio VL (cursiva)

*DIVMTQSPLSLSVTPGEPAISCRSSQSLHTNGYNYLDWYVQKPGQSPQLLIYASNRASGVDPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEDVGVYYCMQALQIPRTFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
HQGLSSPVTKSFNRGEC*

- 10 Secuencias de aminoácidos de los bucles AB y EF del dominio CH3 de FS22-172-003

Bucle AB - RDELPIIIPPYNQ (SEQ ID NO: 171)

Bucle EF - GADRWLEGNV (SEQ ID NO: 172)

Secuencias de aminoácidos de los bucles AB y EF del dominio CH3 de FS22-53-008

Bucle AB - RDELNPPYLFSNQ (SEQ ID NO: 173)

- 15 Bucle EF - DYWRWLEGNV (SEQ ID NO: 174)

Secuencias de aminoácidos de los bucles AB y EF del dominio CH3 de FS22-053-017

Bucle AB - RDELNPPYLFSNQ (SEQ ID NO: 173)

Bucle EF - YHWRWLEGNV (SEQ ID NO: 175)

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de G1/280 02 G02 (SEQ ID NO: 177)

- 20 Dominio VH (cursiva)

*EVQLVQSGAEVVRFGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQ
GRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDTAVYYCARDLFTIFGVSYYYVWGQGTIVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG*

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de G1/280 02 G02 (SEQ ID NO: 178)

Dominio VL (cursiva)

*QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNSVSWYQQFPGKAPKLMIFEVTNRPSGVSDRFSGS
KSDNTASLTISGLQAEDEAEYYCSSFKRGSTLVVFGGGTKLTVLGQPAAPSVTLFPSSSEELQANKA
TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH
EGSTVEKTVAPTECS*

Secuencia de aminoácidos de PD-L1 humano (SEQ ID NO: 179)

- 5 Dominio extracelular (cursiva); dominios transmembrana e intracelular (negrita)

*FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRAR
LLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTC
QAEGYPKAEVIWTTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAEL
VIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET*

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de PD-L1 humano (SEQ ID NO: 180)

*FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRAR
LLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTC
QAEGYPKAEVIWTTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAEL
VIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET*

Secuencia de aminoácidos de PD-L1 de ratón (SEQ ID NO: 181)

- 10 Dominio extracelular (cursiva); dominios transmembrana e intracelular (negrita)

*FTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPKQHSNFRGRA
SLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICQ
AEGYPEAEVIWTTNSDHQPVSGKRSVTTSTRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTA
ELIPELPAHPNERTHWVLLGSILLFLIVSVTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET*

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de PD-L1 de ratón (SEQ ID NO: 182)

*FTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPKQHSNFRGRA
SLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICQ
AEGYPEAEVIWTTNSDHQPVSGKRSVTTSTRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTA
ELIPELPAHPNERTHWVLLGSILLFLIVSVTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET*

Secuencia de aminoácidos de PD-L1 de cynomolgus (SEQ ID NO: 183)

- 15 Dominio extracelular (cursiva); dominios transmembrana e intracelular (negrita)

*FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQRAQ
LLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTC
QAEGYPKAEVIWTTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAEL
VIPELPLALPPNERTHLVILGAIFLLLGVALTFIFYLRKGRMMDMKKCGIRVTNSKKQRDTQLEETKG
PSARFDIPDEIPVIESKPNTLSIVLGTTLTVAMIIVATIFGYRRQKGRRLTLKL*

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de PD-L1 de cynomolgus (SEQ ID NO: 184)

*FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQRAQ
LLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPVTSEHELTC
QAEGYPKAEVIWTTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAEL
VIPELPLALPPNERTHLVILGAIFLLLGVALTFIFYLRKGRMMDMKKCGIRVTNSKKQRDTQLEETKG
PSARFDIPDEIPVIESKPNTLSIVLGTTLTVAMIIVATIFGYRRQKGRRLTLKL*

Secuencia de aminoácidos de CD137 humano (SEQ ID NO: 185)

- 20 Dominio extracelular (cursiva); dominios transmembrana e intracelular (negrita)

*LQDPCSNCPAGTFCDDNNRNIQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSSTNAECDCT
PGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKER
DVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL*

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CD137 humano (SEQ ID NO: 186)

LQDPCSNCPAGTFCDDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCT
PGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKER
DVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQ

Secuencia de aminoácidos de CD137 de ratón (SEQ ID NO: 187)

Dominio extracelular (cursiva); dominios transmembrana e intracelular (negrita)

VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNICRVCAFYFRKKFCSSTHNAECECIE
GFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTNDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEK
DVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLSQVLTFLALTSALLLALIFITLLFSVLKWIRKKFPHIFKQ
5 **PFKKTGTGAQEEDACSCRCPQEEEGGGGYEL**

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CD137 de ratón (SEQ ID NO: 188)

VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNICRVCAFYFRKKFCSSTHNAECECIE
GFHCLGPQCTRCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTNDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEK
DVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLSQVLTFLALTSALLLALIFITLLFSVLKWIRKKFPHIFKQ

Secuencia de aminoácidos de CD137 de cynomolgus (SEQ ID NO: 189)

Dominio extracelular (cursiva); dominios transmembrana e intracelular (negrita)

LQDLCSNCPAGTFCDDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDICIS
GYHCLGAECMSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERD
VVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQIIFFLALTSTVVLFFLLFVLRFVSVKRSRKLLYIFK
10 **QPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL**

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CD137 de cynomolgus (SEQ ID NO: 190)

LQDLCSNCPAGTFCDDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDICIS
GYHCLGAECMSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERD
VVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de G1/HeID1.3 (SEQ ID NO: 191)

Dominio VH (cursiva)

QVQLQESGPGLVRRPSQTLSTCTVSGSTFSGYGVNWRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALKS
RVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGS�VTSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
15 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

Péptido OVA (SEQ ID NO: 192)

ISQAVHAAHAEINEAGR

Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de B7-H3 humano (SEQ ID NO: 193)

ILEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTAL
FPDLAQGNASRLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTI
TCSSYQGYPEAEVFWQDGGQGVPLTGNVTTSGMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQ
QDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCFSFPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHS
FTEGRDQGSAYANRTALFPDLAQGNASRLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKP
SMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGGQGVPLTGNVTTSGMANEQGLFDVHSILRVV
LGANGTYSCLVRNPVLQDAHSSVTITGQPM

Péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: **194**)

SIINFEKL

Secuencia de aminoácidos de PD-L1-rCD4-His humano (SEQ ID NO: **195**)

- 5 Péptido señal (subrayado); dominio extracelular de PD-L1 (fuente regular); 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 (negrita)

MRIFAVFIFMTYWHLLN~~NAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVH~~
GEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKI
NQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEI
FYCTFRRLDPEENHTAELVPELPLAHPNERT**AAAT**SITAYKSEGSAEFSFPLNLGEESLQGELRW
KAEKAPSSQSWITFSLKNQKVSQKSTSNPKFQLSETLPLTLQIPQVSLQFAGSGNLTLDRLGILYQE
VNLVVMKVTQPDNTLTCEVMGPTSPKMRLILKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGE
EVKMDSKIQVLSKGLNGSHHHHHH

Secuencia de aminoácidos de PD-L1-Fc-His humano (SEQ ID NO: **196**)

- 10 Péptido señal (subrayado) 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) Etiqueta de hexahistidina C-terminal (negrita)

MRIFAVFIFMTYWHLLN~~NAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVH~~
GEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKI
NQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEI
FYCTFRRLDPEENHTAELVPELPLAHPNERT**AAADK**THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**SHHH**
HHH

Secuencia de aminoácidos de PD-L1-rCD4-His de ratón (SEQ ID NO: **197**)

- 15 Péptido señal (subrayado); dominio extracelular de PD-L1 (fuente regular); 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 (negrita)

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVA
GEEDLKQPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNPYRKIN
QRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWNSDHQPVSGKRSVTTSTRTEGMLLNVTSSLRVNATANDV
FYCTFWRSQPGQNHTAELIPELPAHPNRT**AAAT**SITAYKSEGSAEFSFPLNLGEESLQGELRW
KAEKAPSSQSWITFSLKNQKVSQKSTSNPKFQLSETLPLTLQIPQVSLQFAGSGNLTLDRLGILYQE
VNLVVMKVTQPDNTLTCEVMGPTSPKMRLILKQENQEARVSRQEKVIQVQAPEAGVWQCLLSEGE
EVKMDSKIQVLSKGLNGSHHHHHH

Secuencia de aminoácidos de PD-L1-Fc-His de ratón (SEQ ID NO: **198**)

- 20 Péptido señal (subrayado) 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) Etiqueta de hexahistidina C-terminal (negrita)

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLYVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVYWEKEDEQVIQFVA
GEEDLKQPQHSNFRGRASLPKDQLLKGNAALQITDVKLQDAGVYCCIISYGGADYKRITLKVNPYRKIN
QRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWNSDHQPVSGKRSVTTSTRTEGMLLNVTSSLRVNATANDV
FYCTFWRSQPGQNHTAELIPELPAHPNRT**AAADK**THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**SHHH**
HHHH

Secuencia de aminoácidos de PD-L1-His-Avi humano (SEQ ID NO: 199)

Dominio extracelular de PD-L1 (fuente regular) etiqueta de hexahistidina C-terminal (cursiva) etiqueta Avi (negrita)

FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRAR
LLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHETC
QAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAEL
VIPELPLAHPNERGSHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE

Secuencias de ácido nucleico con codones optimizados que codifican la cadena pesada de FS22-172-003-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 32)

5

AAGCTTGCCGCCACCATGGAATGGTCCTGGGTGTTCTGTTCTTCTGTCCTGACCACCGGCG
TGCACTCTGAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAAAGACCTGGCGCCTCTGTGAA
GGTGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACCCCTTTACCTCCTACGGCATCTCCTGGGTCCGACAGGCT
CCTGGACAAGGCTTGAATGGATGGGCTGGATCTCCGCTTATTCCGGCGGCACCAATTACGCC
AGAAACTGCAGGGCAGAGTGACCATGACCACCGACACCTCTACCTCCACCGCCTACATGGAAC
GCGGTCCCTGAGATCTGACGACACCGCCGTGTAATACTGCGCCAGAGATCTGTTCCCCACCATC
TTCGGCGTGTCTACTACTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCTGCTTCTA
CCAAGGGACCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGC
TCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGAACCTCTGGCGCT
CTGACATCTGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCCTCCGGCCTGTACTCTGTCTCT
CTGTCTGTGACCGTGCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAA
GCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGT
CCTCCATGTCTGCTCCAGAAGCTGTGCGCGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTA
AGGACACCCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGA
GGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGACACAACGCCAAGACCAA
GCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCA
GATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCG
AAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCTTGCCTCCATC
TCGGGACGAGCTGCCCTACATCATCCCTCCATACAACAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAG
GGCTTCTACCCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACATA
AGACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGG
CGCCGACAGATGGCTGGAAGGGAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA
TCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTGTCTGTCCTGGCAAG TGATGAATTC

Secuencias de ácido nucleico con codones optimizados que codifican la cadena ligera de FS22-172-003-AA/E12v2 (SEQ ID NO: 39)

AAGCTTGCCGCCACCATGTCTGTGCCTACACAGGTTCTGGGACTGCTGCTGTGTGGCTGACCG
ACGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACACTGTCCGCCTCTGTGCGGGACAG
AGTGATCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGTCCATCGGCAACAGACTGGCCTGGTATCAGCACAAAG
CCTGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGAGGCCTCCACATCTGAGACAGGCGTGCCCTCTA
GATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGA
CTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCTACAGCACCCCTTACACCTTTGGCCAGGGCACCAG
CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAAGCGACGAGCAG
CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCAAGGAGGCCAAG
GTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCA
GGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAG
CTTCAACAGGGGCGAGTGTGATGAATTC

10

REFERENCIAS

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3), 403-10 (1990).
- 5 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17), 3389-402 (1997).
- Bagshawe KD, Sharma SK, Springer CJ, Antoniow P, Rogers GT, Burke PJ, Melton R. Antibody- enzyme conjugates can generate cytotoxic drugs from inactive precursors at tumor sites. *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4, 915-922 (1991).
- 10 Baird JR *et al.* Immune-mediated regression of established B16F10 melanoma by intratumoral injection of attenuated *Toxoplasma gondii* protects against rechallenge. *J Immunol.* 190(1): 469-478 (2013).
- Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol.* jun 8;5, 1 17 (2015).
- Bartkowiak T *et al.* Activation of 4-1BB on Liver Myeloid Cells Triggers Hepatitis via an Interleukin-27-Dependent Pathway. *Clin Cancer Res.* 24(5), 1138-51 (2018).
- 15 Bergman I, Burckart GJ, Pohl CR, Venkataramanan R, Barmada MA, Griffin JA y Cheung NV. Pharmacokinetics of IgG and IgM Anti-Ganglioside Antibodies in Rats and Monkeys After Intrathecal Administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 284(1), 111-115 (1998)
- Bitra A, Doukov T, Wang J, Picarda G, Benedict CA, Croft M, Zajonc DM. Crystal structure of murine 4-1BB and its interaction with 4-1BBL support a role for galectin-9 in 4-1BB signaling. *J Biol Chem.* 293(4):1317-1329 (2017).
- 20 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, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daeron M. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 113(16):3716-25 (2009).
- 25 Chacon JA, Wu RC, Sukhumalchandra P, Molldrem JJ, Sarnaik A, Pilon-Thomas S, Weber J, Hwu P, Radvanyi L. Co-stimulation through 4-1BB/CD137 improves the expansion and function of CD8(+) melanoma tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive T-cell therapy. *PLoS One.* 8(4):e60031 (2013).
- 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).
- 30 Chester C, Ambulkar S, Kohrt HE. 4-1BB agonism: adding the accelerator to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 65(10):1243-8 (2016).
- Chester C, Sanmamed MF, Wang J, Melero I. Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood.* 131 (1):49-57 (2018).
- 35 Claus C *et al.* A novel tumor-targeted 4-1BB agonist and its combination with T-cell bispecific antibodies: an off-the-shelf cancer immunotherapy alternative to CAR T-cells [resumen]. En: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017. *Cancer Res.* 77 (2017).
- Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol.* 3(8):609-20 (2003).
- 40 Curran MA, Geiger TL, Montalvo W, Kim M, Reiner SL, Al-Shamkhani A, Sun JC, Allison J. P. Systemic 4-1BB activation induces a novel T cell phenotype driven by high expression of Eomesodermin. *J. Exp. Med.* 210(4): 743-755 (2013).
- Dubrot J *et al.* Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. *Cancer Immunol Immunother.* 59(8): 1223-1233 (2010).
- 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).
- 45 Fisher TS *et al.* Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes anti-tumor activity. *Cancer Immunol Immunother.* 61 (10): 1721-33 (2012).
- 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. *Journal for Immunotherapy of Cancer.* 1 (Supl 1):P53. (2013).

- Hasenhindl C, Traxlmayr MW, Wozniak-Knopp G, Jones PC, Stadlmayr G, Rüker F, Obinger C. Stability assessment on a library scale: a rapid method for the evaluation of the commutability and insertion of residues in C-terminal loops of the CH3 domains of IgG1-Fc. *Protein Eng. Des. Sel.*, 26(10), 675-82 (2013).
- 5 Hezareh M, Hessel AJ, Jensen RC, van de Winkel JG, Parren PW. Effector 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).
- Hinner MJ, Aiba, RSB., Wiedenmann A, Schlosser C, Allersdorfer A, Matschiner G, Rothe C, Moebius U, Kohrt HE, Olwill SA. Costimulatory T cell engagement via a novel bispecific anti-CD137 /anti-HER2 protein. *J. Immunotherapy Cancer* 3 (Supl 2): P187. (2015).
- 10 Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* 23(9): 1126-36 (2005).
- 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).
- 15 Hurtado JC, Kim YJ, Kwon BS. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol.* 15; 158(6):2600-9 (1997).
- 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).
- Jain T *et al.* Biophysical properties of the clinical-stage antibody landscape. *PNAS* 114 (5), 944-949 (2017).
- 20 Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange G, Ling NR, Lowe J, Walker MR, Phillips DJ, Aloisio CH, Wells TW. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes: results of an IUIS/WHO collaborative study. *Immunol. Lett.* 10(3-4), 223-52 (1985).
- Jefferis R, Reimer CB, Skvaril F, de Lange GG, Goodall DM, Bentley TL, Phillips DJ, Vlug A, Harada S, Radi J. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG subclasses: results of the 2nd IUIS/WHO collaborative study. *Immunol. Lett.* 31(2), 143-68 (1992).
- 25 Juneja VR, McGuire KA, Manguso RT, LaFleur MW, Collins N, Haining WN, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8+ T cell cytotoxicity. *J Exp Med.* 214(4), 895-904 (2017).
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed. NIH Publication No. 91-3242. Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services (1991).
- 30 Kim YH, Choi BK, Kim KH, Kang SW, Kwon BS. Combination Therapy with Cisplatin and Anti-4-1BB. *Cancer Res.* 68(18), 7264-7269 (2009).
- 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).
- 35 Kleinovink JW, Marijt KA, Schoonderwoerd MJA, Hall T, Ossendorp F, Fransen MF. PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy. *Oncoimmunology.* 6(4), e1294299 (2017).
- Kocak E *et al.* Combination therapy with anti-CTL antigen-4 and anti-4-1BB antibodies enhances cancer immunity and reduces autoimmunity. *Cancer Res.* 15;66(14), 7276-84 (2006).
- Lechner MG *et al.* Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J Immunother.* 36(9), 477-89 (2013).
- 40 Ledermann JA, Begent RH, Massof C, Kelly AM, Adam T, Bagshawe KD. A phase-I study of repeated therapy with radiolabelled antibody to carcinoembryonic antigen using intermittent or continuous administration of cyclosporin A to suppress the immune response. *Int. J. Cancer* 47(5), 659-64 (1991).
- Lefranc MP *et al.* IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system® 25 years on. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D413-22 (2015).
- 45 Lefranc MP *et al.* IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains. *Dev. Comp. Immunol.* 29(3), 185-203 (2005).
- Li F. y Ravetech JV. Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential FcγRIIB coengagement *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(48), 19501-6 (2013).

- Link A *et al.* Preclinical pharmacology of MP0310: a 4-1BB/FAP bispecific DARPIn drug candidate promoting tumor-restricted T cell co-stimulation [resumen]. En: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2018 abr 14-18; Chicago (IL) Resumen no. 3752 (2018).
- Makkouk A, Chester C, Kohrt HE. Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*. 54, 112-119 (2016).
- 5 Martins JP, Kennedy PJ, Santos HA, Barrias C, Sarmiento B. A comprehensive review of the neonatal Fc receptor and its application in drug delivery. *Pharmacol. Ther.* 161, 22-39 (2016).
- Niu L *et al.* Cytokine-mediated disruption of lymphocyte trafficking, hemopoiesis, and induction of lymphopenia, anemia, and thrombocytopenia in anti-CD137-treated mice. *J Immunol.* 178(7), 4194-4213 (2007).
- 10 Pérez-Ruiz E, Etxeberria I, Rodríguez-Ruiz, Melero I. Anti-CD137 and PD-1/PD-L1 Antibodies En Route toward Clinical Synergy. *Clin. Cancer Res.* 23, (18) (2017)
- Reichen C *et al.* FAP-mediated tumor accumulation of a T-cell agonistic FAP/4-1BB DARPIn drug candidate analyzed by SPECT/CT and quantitative biodistribution [resumen]. En: Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2018 abr 14-18; Chicago (IL) Resumen no. 3029 (2018).
- 15 Schofield DJ *et al.* Application of phage display to high throughput antibody generation and characterization. *Genome Biol.* 8(11), R254 (2007).
- Segal NH *et al.* Phase I Study of Single-Agent Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Patients with Advanced Cancer. *Clin Cancer Res.* 24(8): 1816-1823 (2018).
- Segal NH *et al.* Results from an Integrated Safety Analysis of Urelumab, an Agonist Anti-CD137 Monoclonal Antibody. *Clin Cancer Res.* 23(8): 1929-1936 (2017).
- 20 Shuford WW *et al.* 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification *in vivo* of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med.* 186(1), 47-55 (1997).
- Smith TF, Waterman MS. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147(1), 195-7 (1981).
- Taraban VY *et al.* Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *Eur. J. Immunol.* 32, 3617-3627 (2002).
- 25 Tello, D, Goldbaum, FA, Mariuzza, RA, Ysern, X, Schwarz, FP, Poljak, RJ. Three-dimensional structure and thermodynamics of antigen binding by anti-lysozyme antibodies, *Biochem Soc. Trans.*, 21(4), 943-6 (1993).
- Tolcher AW *et al.* Phase Ib Study of Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Combination with Pembrolizumab (MK-3475) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin. Cancer Res.* 23, 5349-57 (2017)
- 30 Wang X, Mathieu M, Brezski RJ. IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 9(1), 63-73 (2018).
- Wen T, Bukczynski J, Watts TH. 4-1BB ligand-mediated costimulation of human T cells induces CD4+ and CD8+ T cell expansion, cytokine production, and the development of cytolytic effector function. *J Immunol.* 168(10), 4897-906 (2002).
- 35 Wolf M, Kuball J, Ho WY, Nguyen H, Manley TJ, Bleakley M, Greenberg PD. Activation-induced expression of CD 137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood.* 110(1):201 -10 (2007).
- Won EY, Cha K, Byun JS, Kim DU, Shin S, Ahn B, Kim YH, Rice AJ, Walz T, Kwon BS, Cho HS. The structure of the trimer of human 4-1BB ligand is unique among members of the tumor necrosis factor superfamily. *J Biol Chem.* 285(12), 9202-10 (2010).
- 40 Wozniak-Knopp G *et al.* Introducing antigen-binding sites in structural loops of immunoglobulin constant domains: Fc fragments with engineered HER2/neu-binding sites and antibody properties. *Protein Eng Des Sel.* 23(4), 289-97 (2010).
- Ye Q, Song DG, Poussin M, Yamamoto T, Best A, Li C, Coukos G, Powell DJ Jr. CD137 accurately identifies and enriches for naturally occurring tumor-reactive T cells in tumor. *Clin Cancer Res.* 20(1):44-55 (2014).
- 45 Yu X, Anasetti C. CH 10 - T-cell costimulation in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.* 195-222 (2013).
- Zanetti M. Tapping CD4 T Cells for Cancer Immunotherapy: The Choice of Personalized Genomics. *J Immunol.* 194:2049-2056 (2015).

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que se une al ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y CD137, que comprende:
 - (a) un sitio de unión a antígeno basado en la región determinante de la complementariedad (CDR) para PD-L1; y
 - (b) un sitio de unión al antígeno CD137 localizado en un dominio CH3 de la molécula de anticuerpo, en donde el sitio de unión al antígeno CD137 comprende una primera secuencia y una segunda secuencia localizadas en los bucles estructurales AB y EF del dominio CH3, respectivamente, en donde la primera secuencia está localizada entre las posiciones 14 y 17 del dominio CH3 y la segunda secuencia está localizada entre las posiciones 91 y 99 del dominio CH3, en donde la numeración de residuos de aminoácidos es según el esquema de numeración de IMGT, y
- 5 en donde la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH, el dominio VL, la primera secuencia y la segunda secuencia expuestas en:
 - (i) SEQ ID NO 12, 14, 113 y 114, respectivamente [FS22-172-003-AA/E12v2];
 - (ii) SEQ ID NO 23, 25, 113 y 114, respectivamente [FS22-172-003-AA/E05v2];
 - (iii) SEQ ID NO 23, 30, 113 y 114, respectivamente [FS22-172-003-AA/G12v2];
 - (iv) SEQ ID NO 12, 14, 79 y 80, respectivamente [FS22-053-008-AA/E12v2];
 - 15 (v) SEQ ID NO 23, 25, 79 y 80, respectivamente [FS22-053-008-AA/E05v2];
 - (vi) SEQ ID NO 12, 14, 79 y 89, respectivamente [FS22-053-017-AA/E12v2];
 - (vii) SEQ ID NO 23, 25, 79 y 89, respectivamente [FS22-053-017-AA/E05v2]; o
 - (viii) SEQ ID NO 23, 30, 79 y 89, respectivamente [FS22-053-017-AA/G12v2].
- 20 2. La molécula de anticuerpo según la reivindicación 1, en donde la molécula de anticuerpo comprende el dominio VH y el dominio VL expuestos en las SEQ ID NO 12 y 14, respectivamente [E12v2].
3. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de anticuerpo comprende el dominio CH3 expuesto en la SEQ ID NO: 115 [FS22-172-003], SEQ ID NO: 81 [FS22-053-008], o SEQ ID NO: 90 [FS22-053-017].
- 25 4. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de anticuerpo comprende la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo:
 - (i) FS22-172-003-AA/E12v2 expuesto en las SEQ ID NO 134 y 17, respectivamente;
 - (ii) FS22-172-003-AA/E05v2 expuesto en las SEQ ID NO 137 y 28, respectivamente;
 - (iii) FS22-172-003-AA/G12v2 expuesto en las SEQ ID NO 140 y 33, respectivamente;
 - (iv) FS22-053-008-AA/E12v2 expuesto en las SEQ ID NO 143 y 17, respectivamente;
 - 30 (v) FS22-053-008-AA/E05v2 expuesto en las SEQ ID NO 146 y 28, respectivamente;
 - (vi) FS22-053-017-AA/E12v2 expuesto en las SEQ ID NO 152 y 17, respectivamente;
 - (vii) FS22-053-017-AA/E05v2 expuesto en las SEQ ID NO 153 y 28, respectivamente; o
 - (viii) FS22-053-017-AA/G12v2 expuesto en las SEQ ID NO 154 y 33, respectivamente.
- 35 5. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de anticuerpo comprende la cadena pesada y la cadena ligera expuestas en las SEQ ID NO 134 y 17, respectivamente [FS22-172-003-AA/E12v2].
6. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dominio CH3 de la molécula de anticuerpo comprende además un resto de lisina adicional (K) en el extremo C inmediato de la secuencia del dominio CH3.
- 40 7. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 y 6, en donde:
 - (i) la molécula de anticuerpo se ha modificado para reducir o anular la unión del dominio CH2 de la molécula de anticuerpo a uno más receptores Fcγ; y/o
 - (ii) la molécula de anticuerpo no se une a uno más receptores Fcγ.

8. Una molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican la molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Un vector o vectores que comprenden la molécula o moléculas de ácido nucleico según la reivindicación 8.
- 5 10. Una célula huésped recombinante que comprende la(s) molécula(s) de ácido nucleico según la reivindicación 8, o el o los vectores según la reivindicación 9.
11. Un método para producir la molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar la célula huésped recombinante de la reivindicación 10 en condiciones para la producción de la molécula de anticuerpo.
12. El método según la reivindicación 11, que comprende además aislar y/o purificar la molécula de anticuerpo.
- 10 13. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. La molécula de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un individuo.

Figura 1A

[illegible]

Figura 18

	EF																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104		105	106	107	108	109	110	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
IMGT																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							

Figure 10

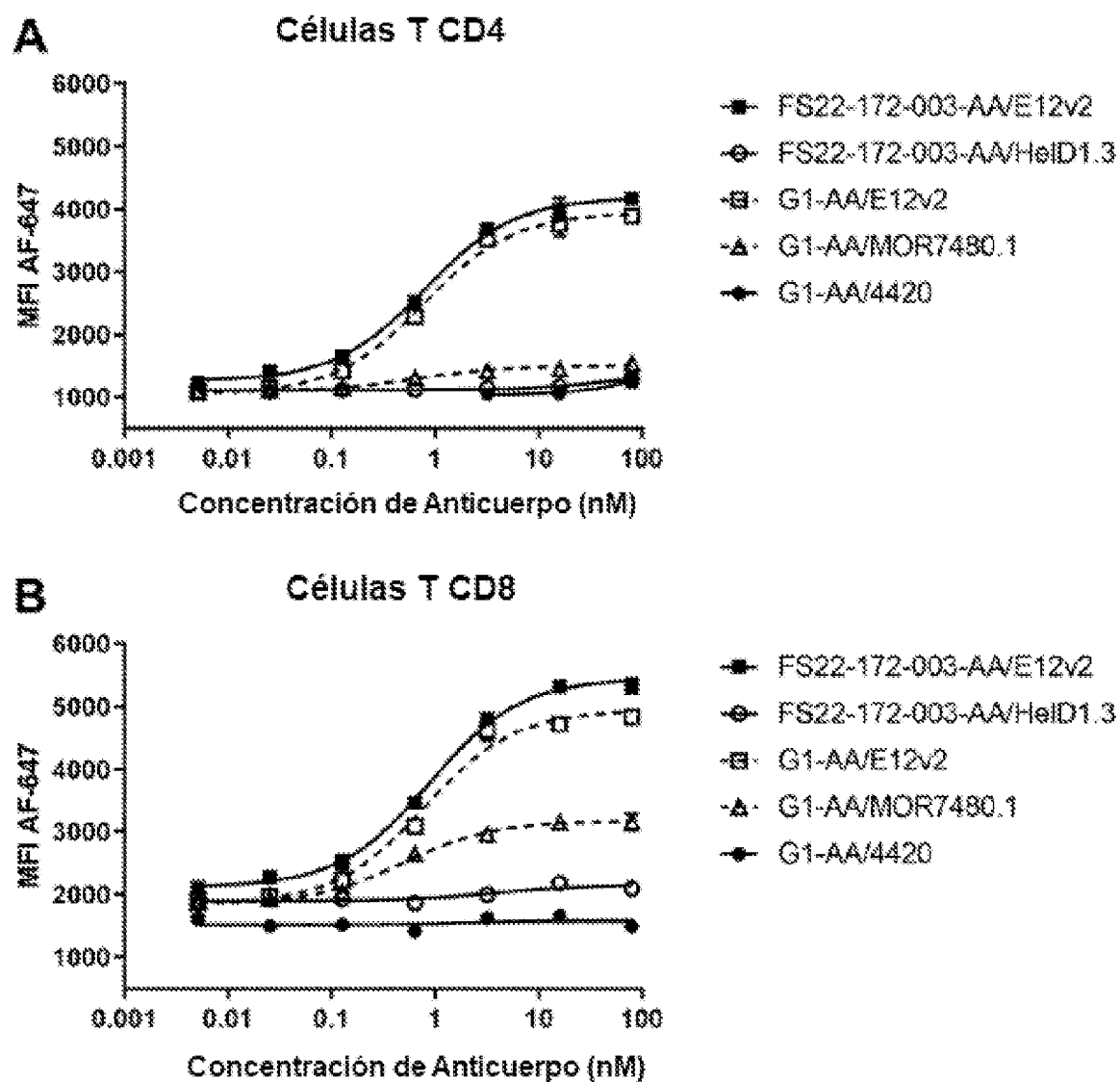


Figura 2

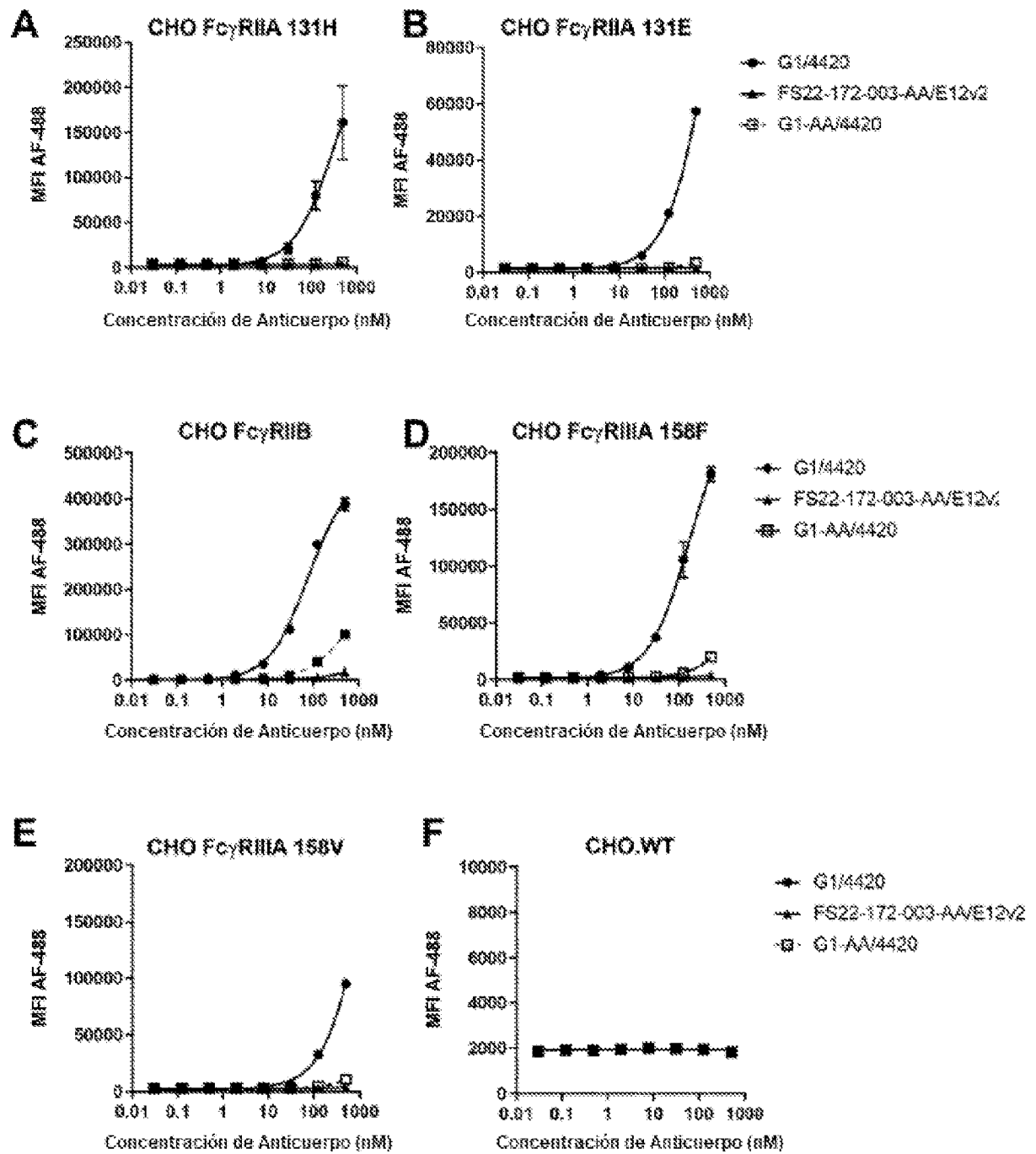


Figura 3

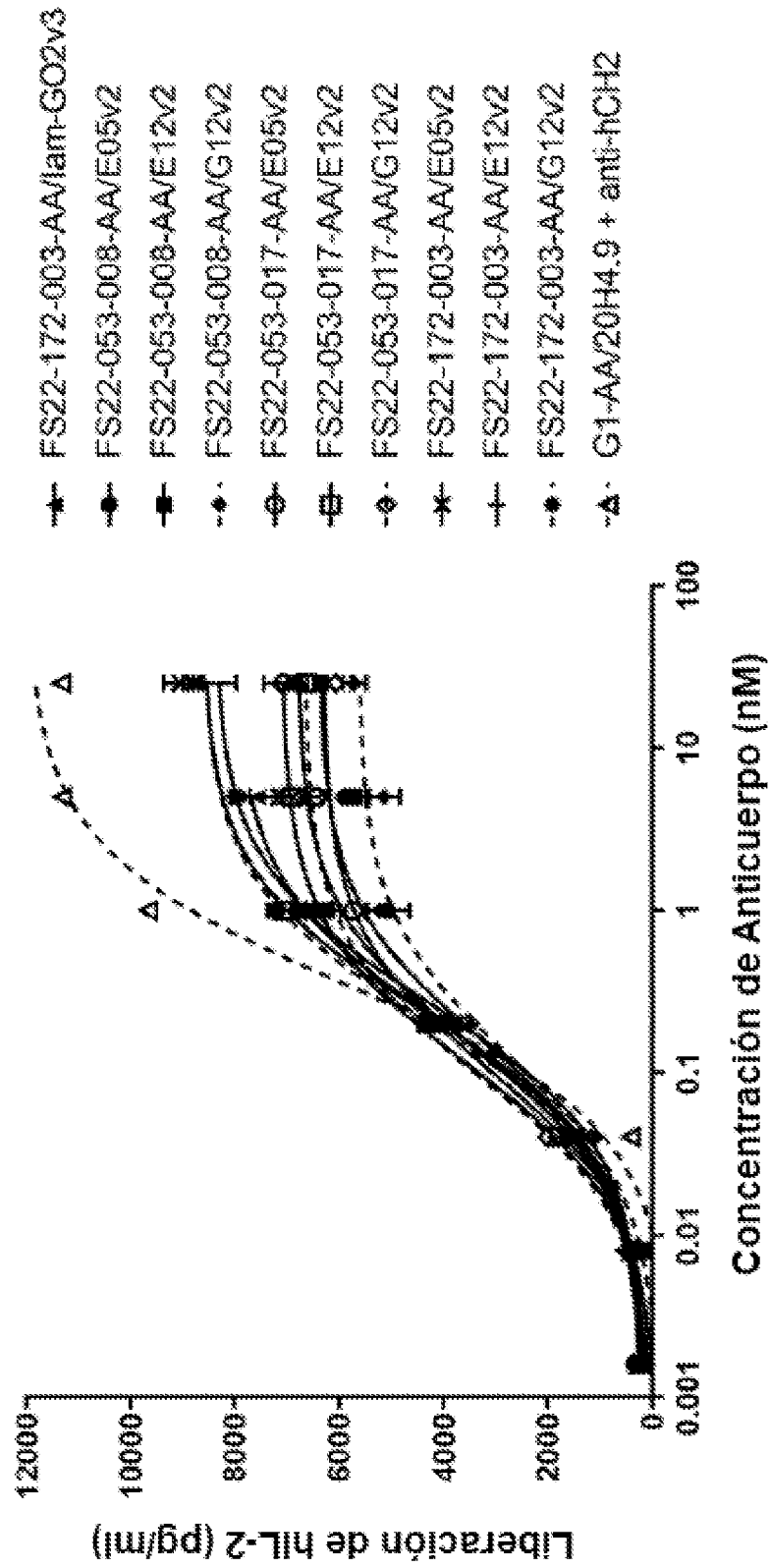


Figura 4

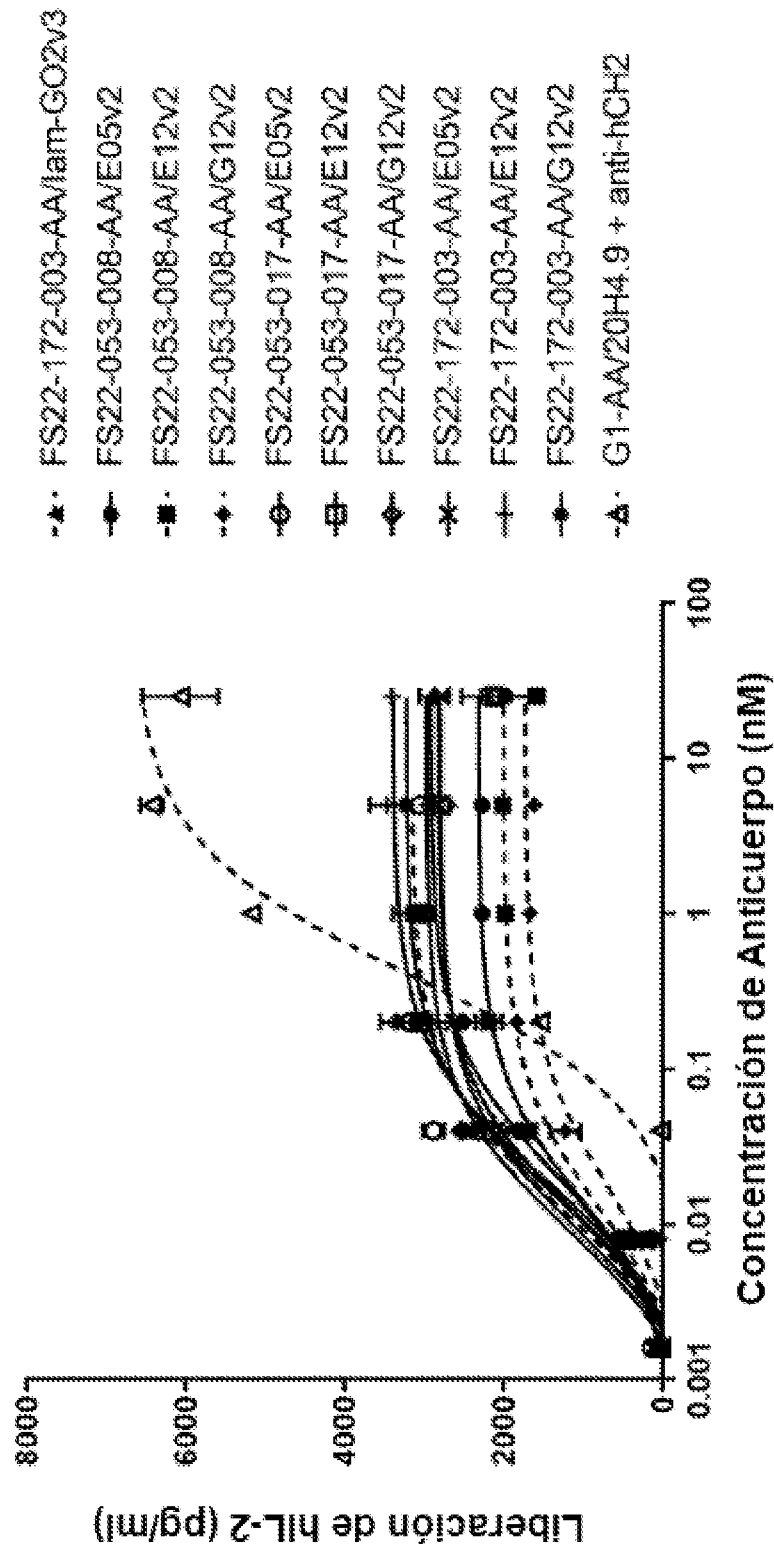


Figura 5

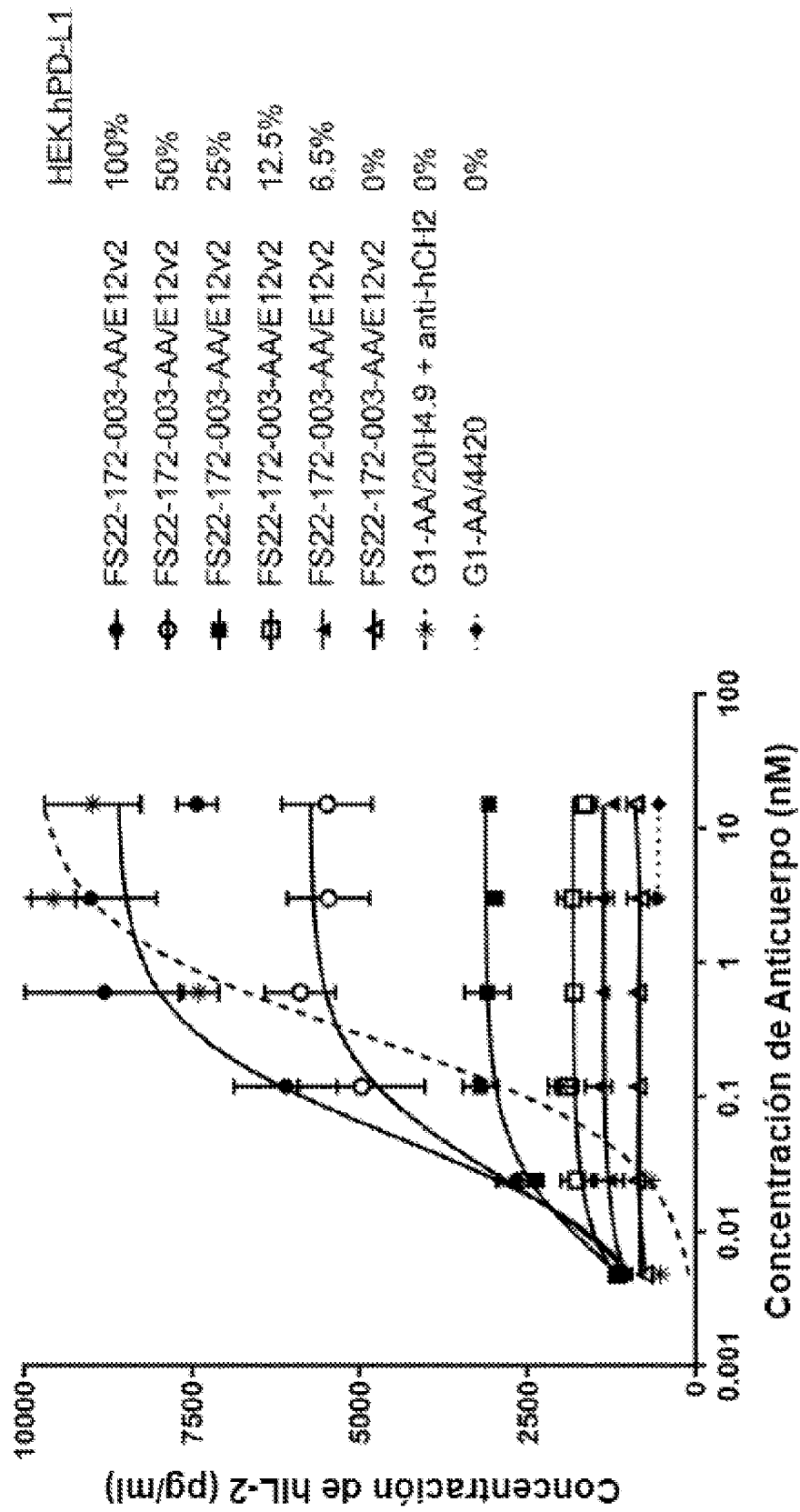


Figura 6

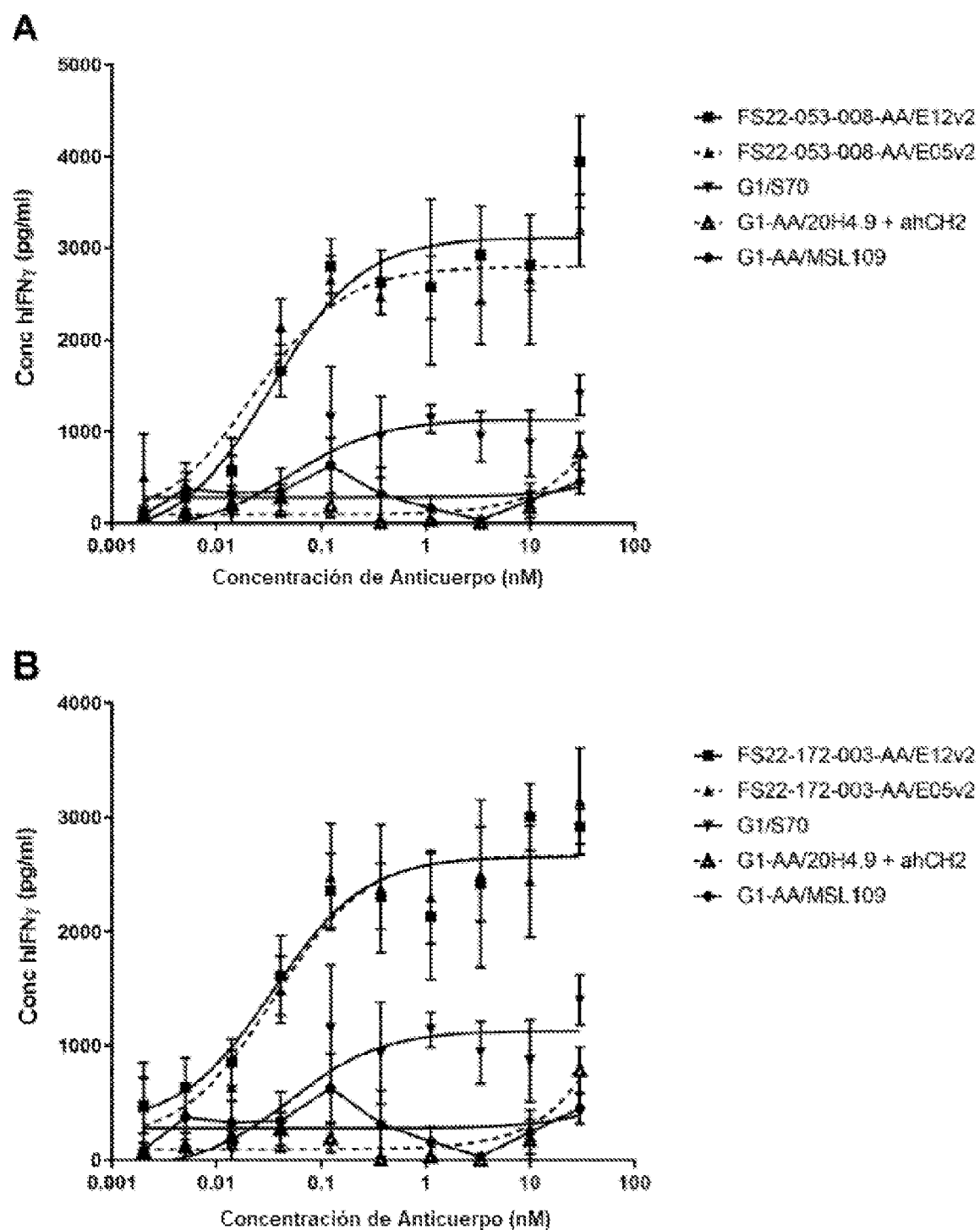


Figura 7

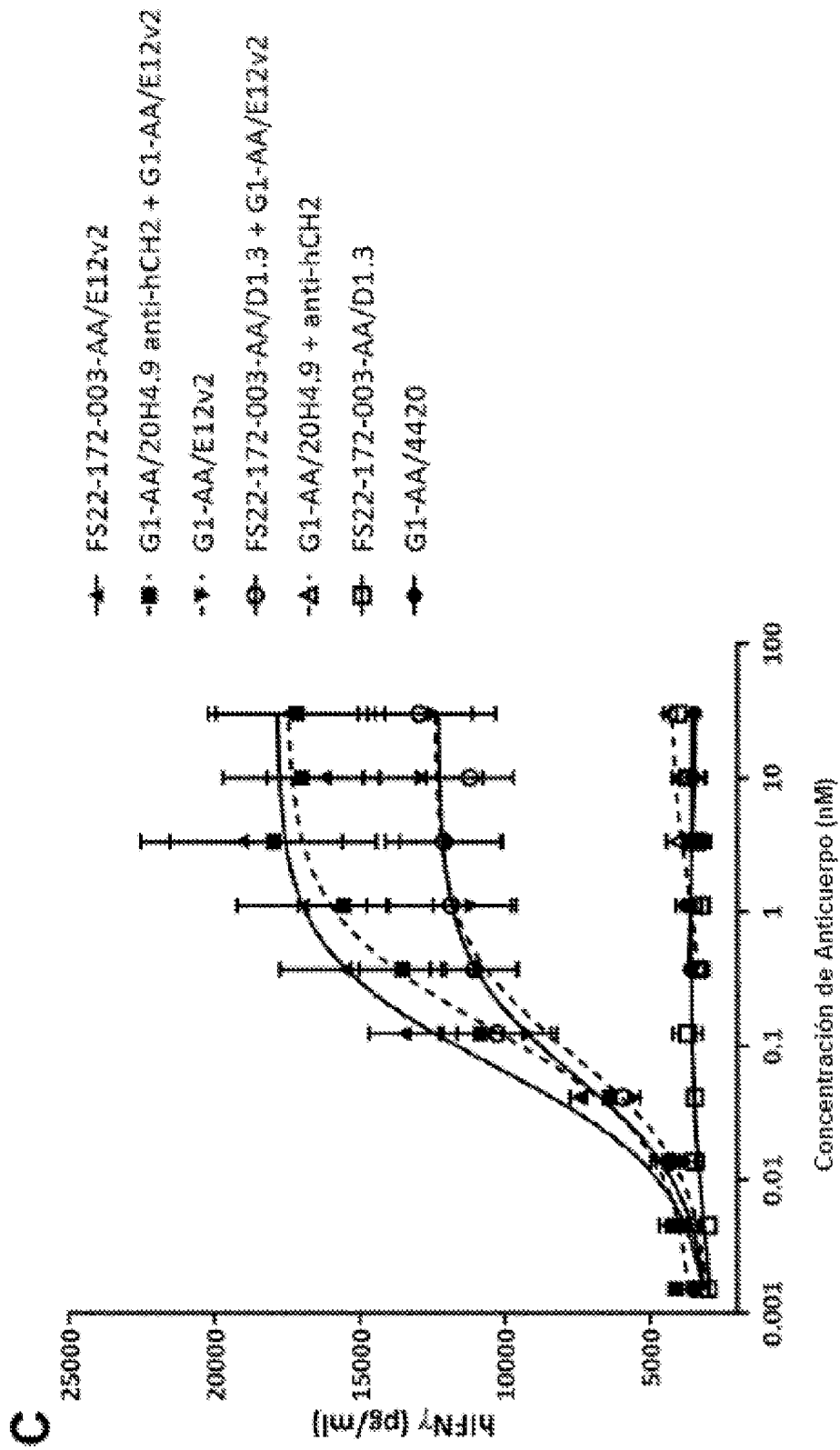


Figura 7 continuación

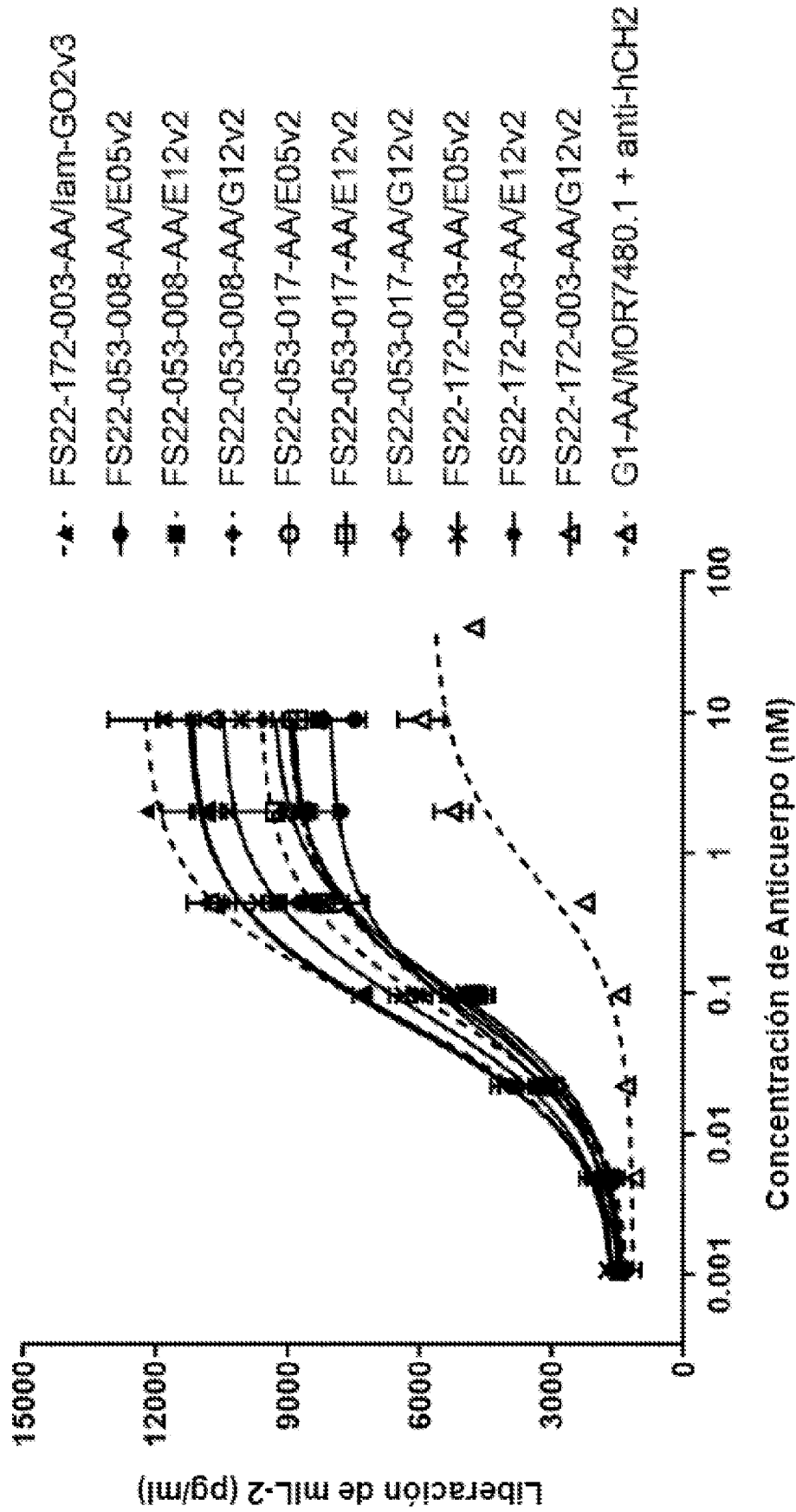


Figura 8

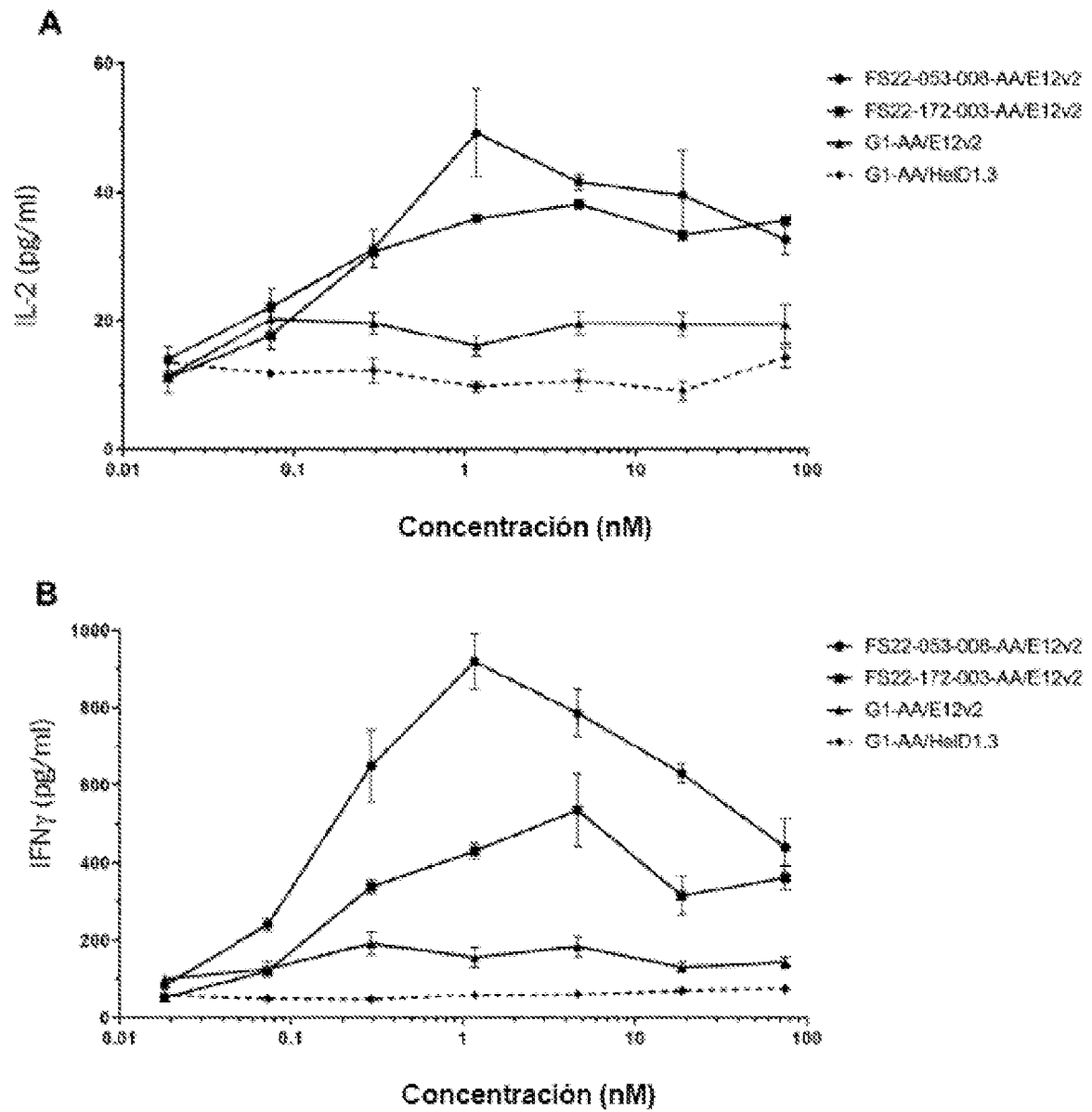


Figura 9

Ensayo de Activación de Células T con CD137 de ratón DO11.10
Reticulación con Proteína L

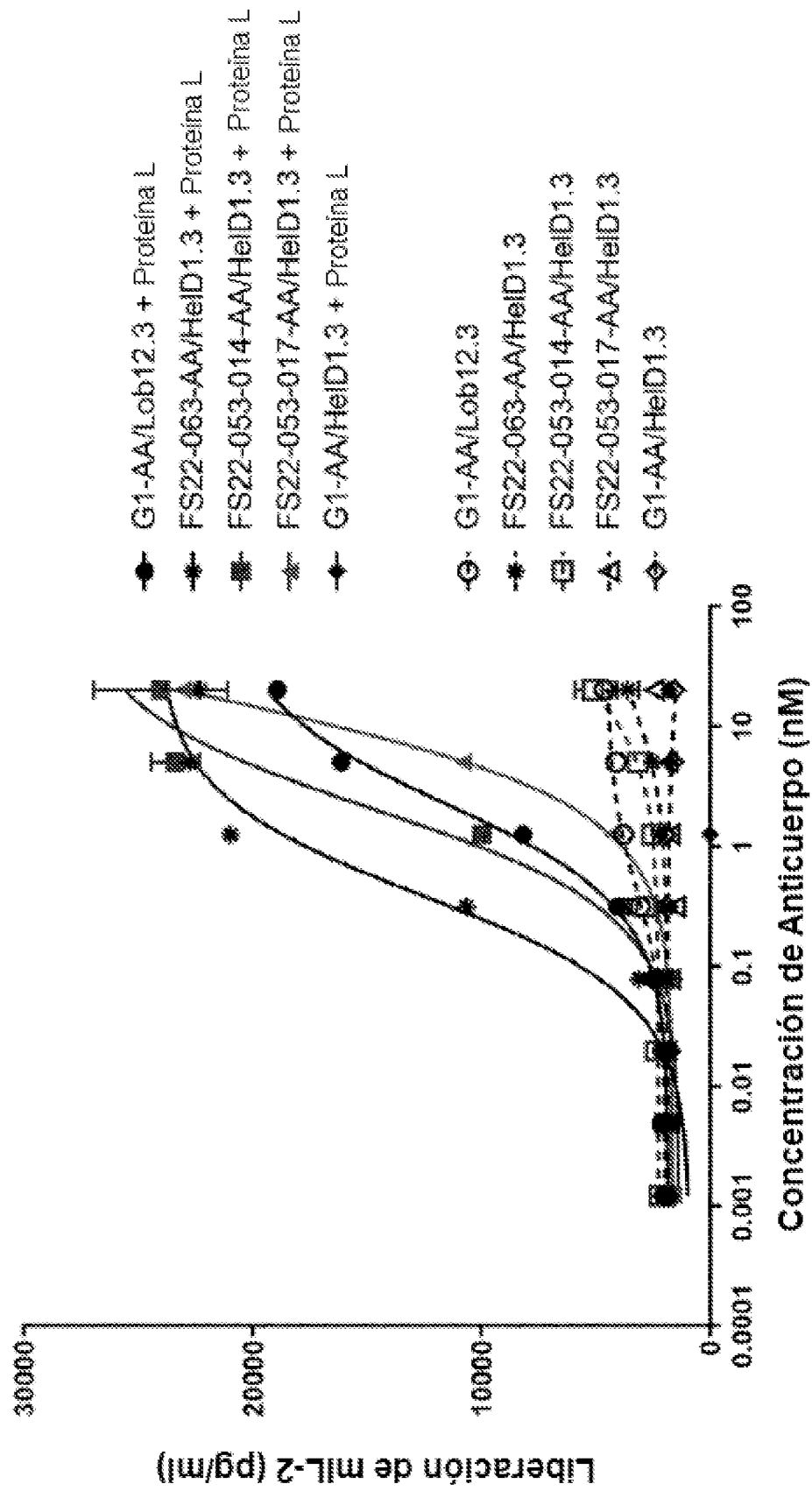


Figura 10

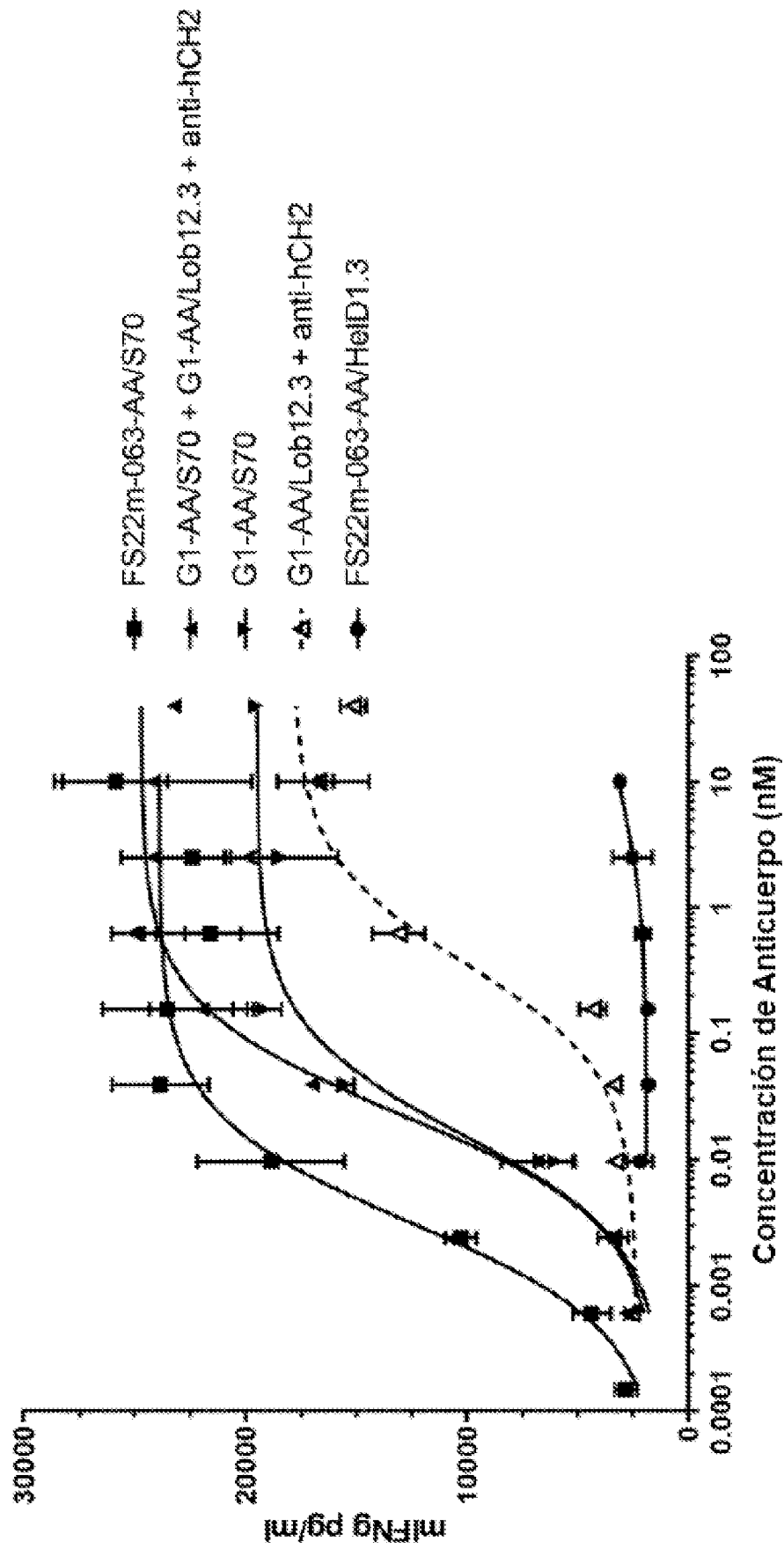


Figura 11

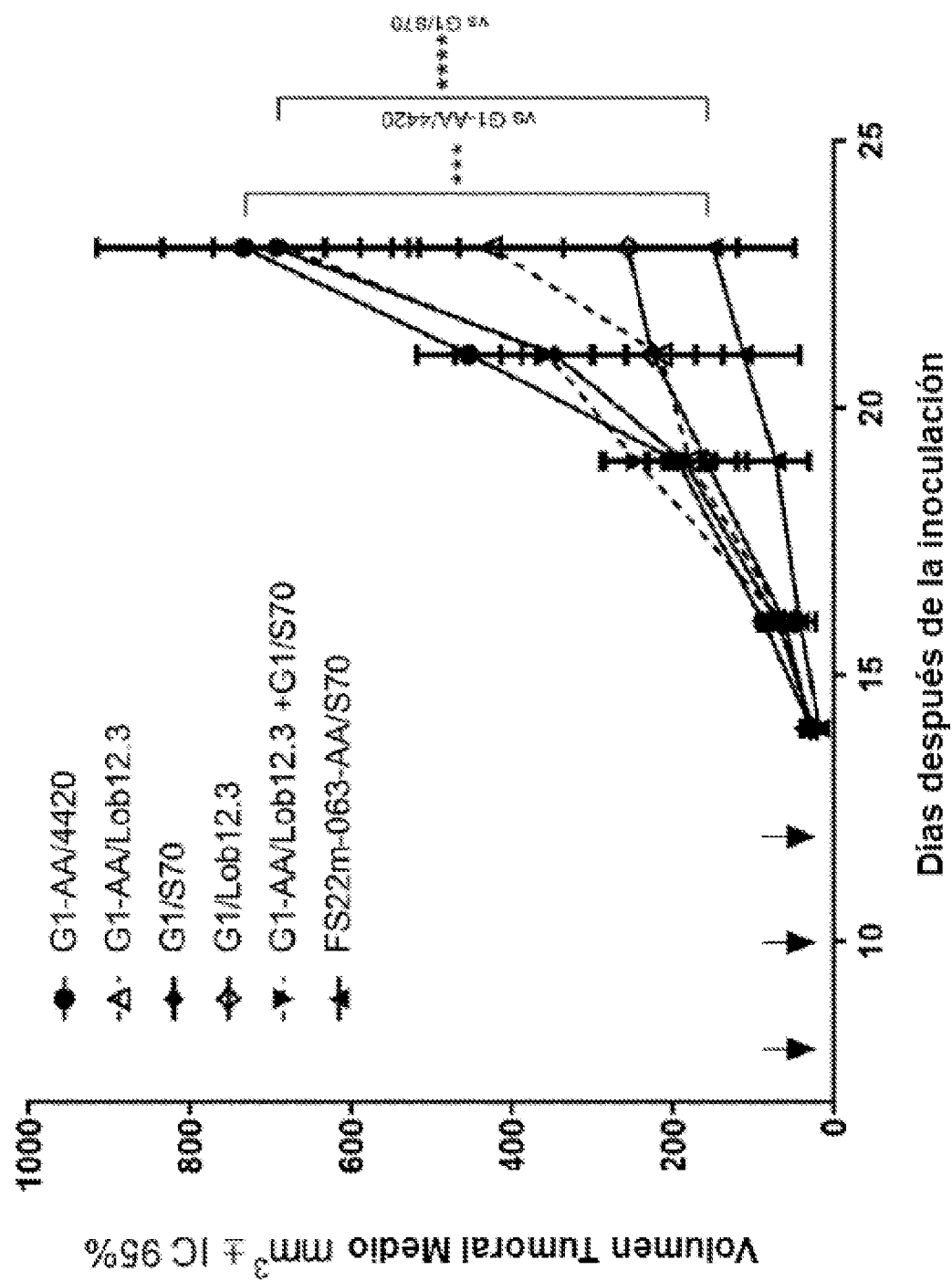


Figura 12

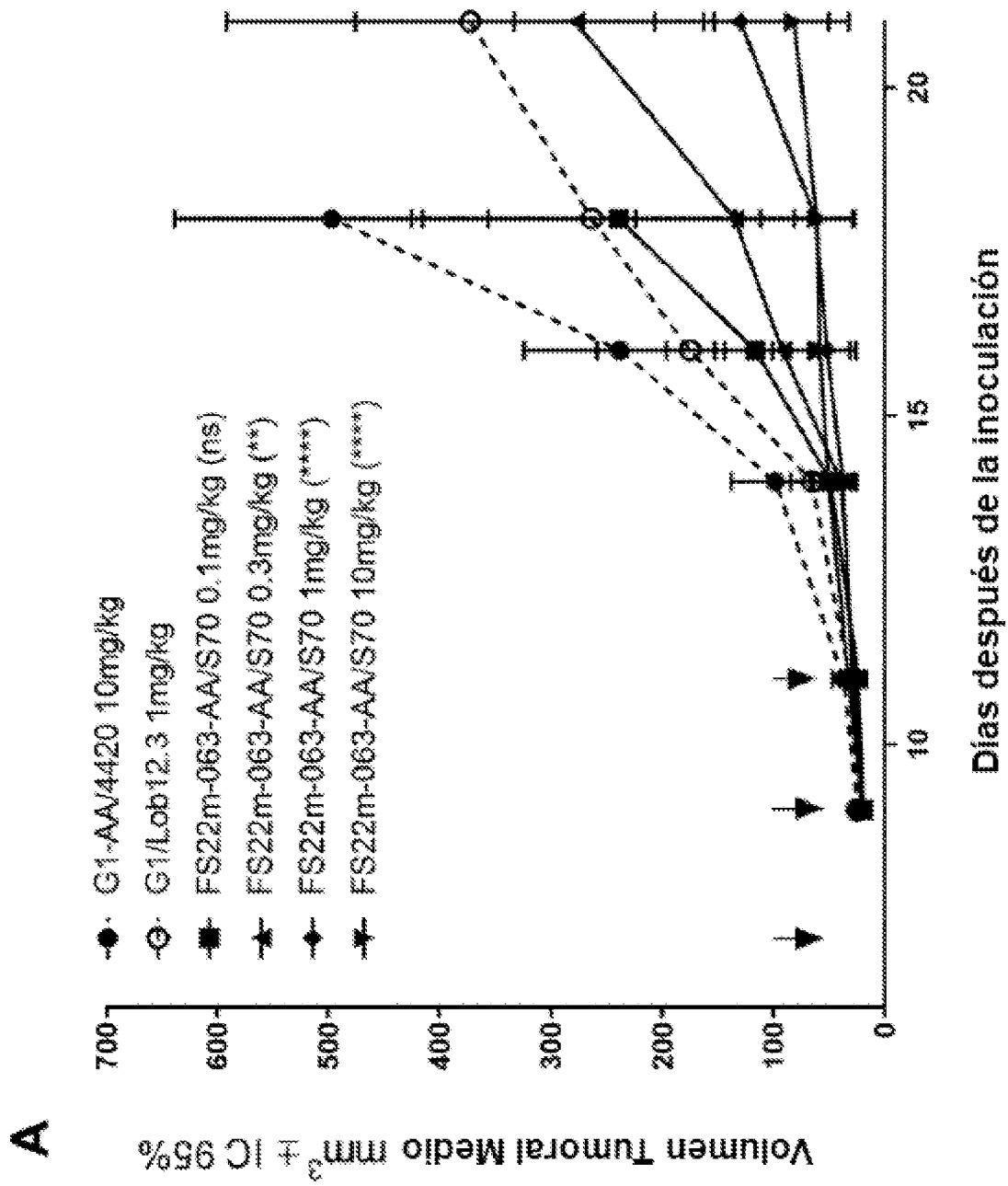


Figura 13

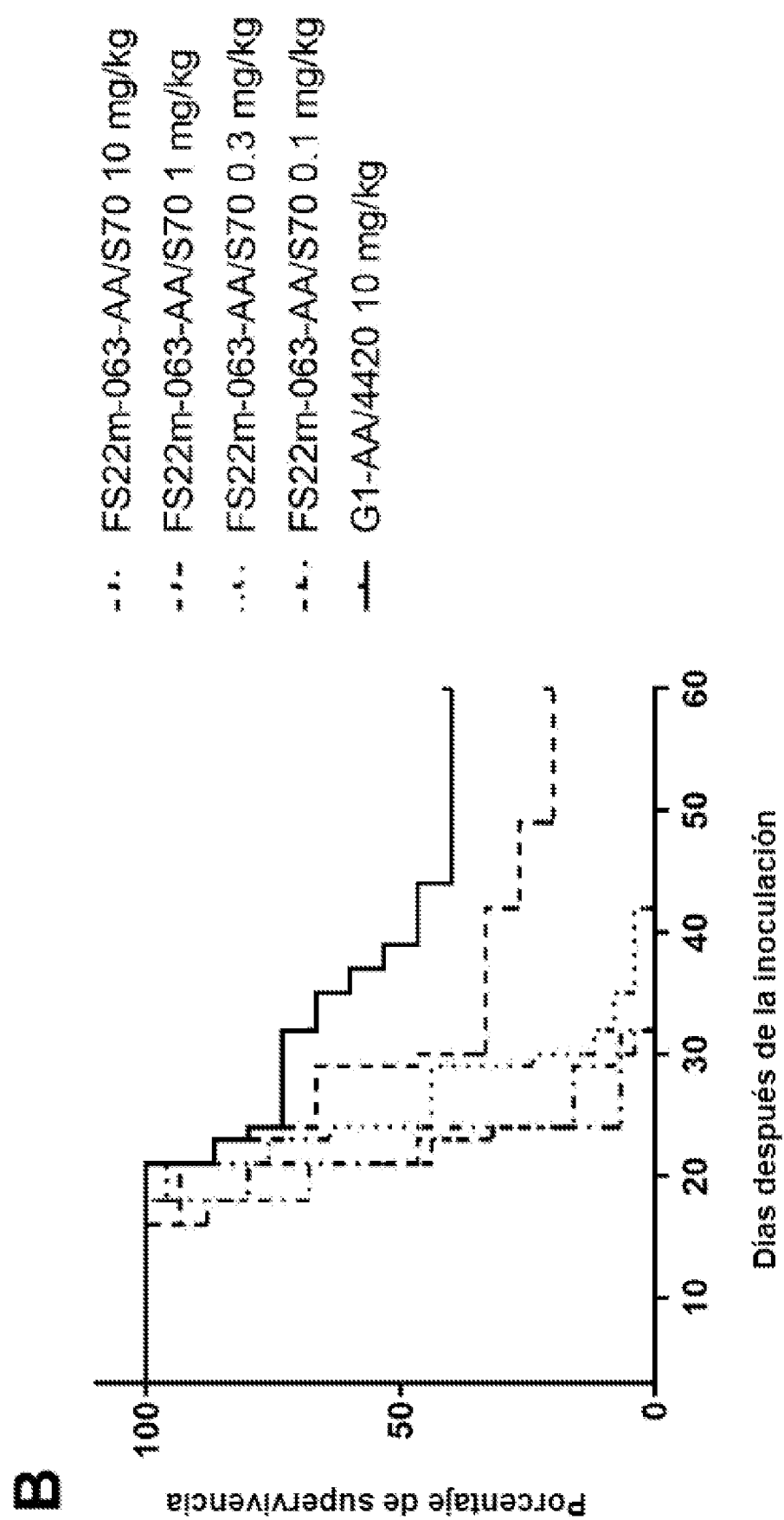


Figura 13 continuación

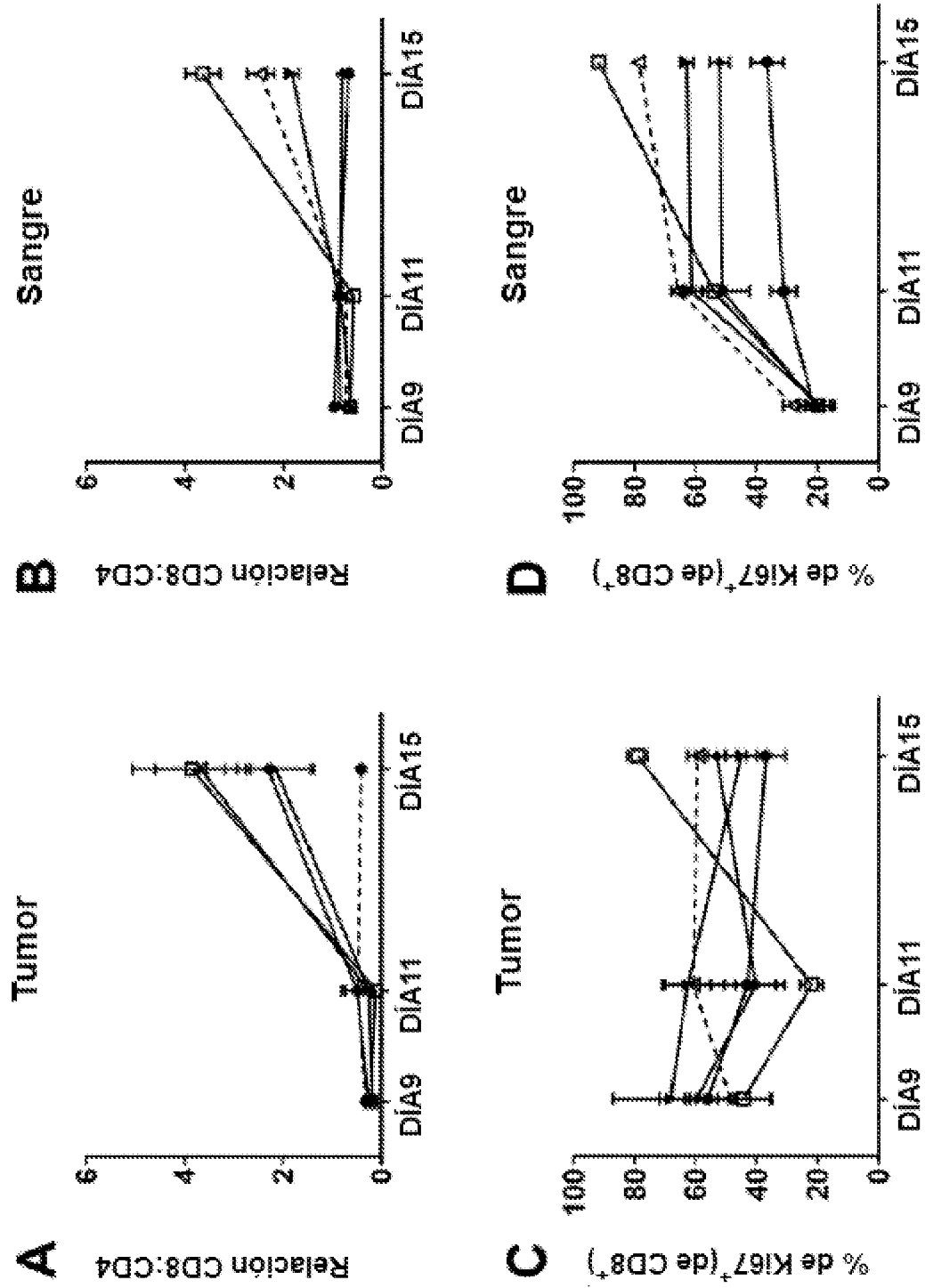


Figura 14

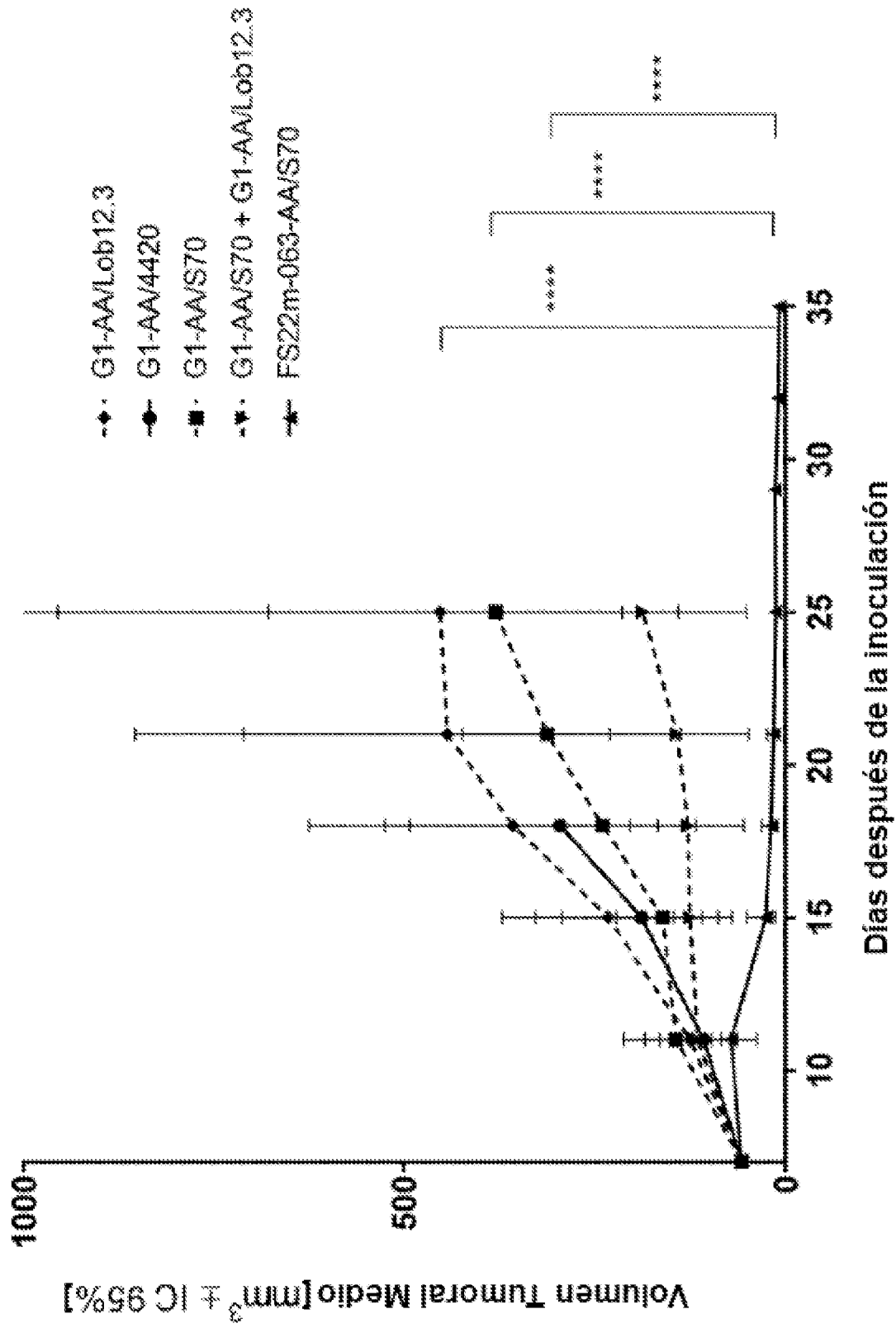


Figura 15

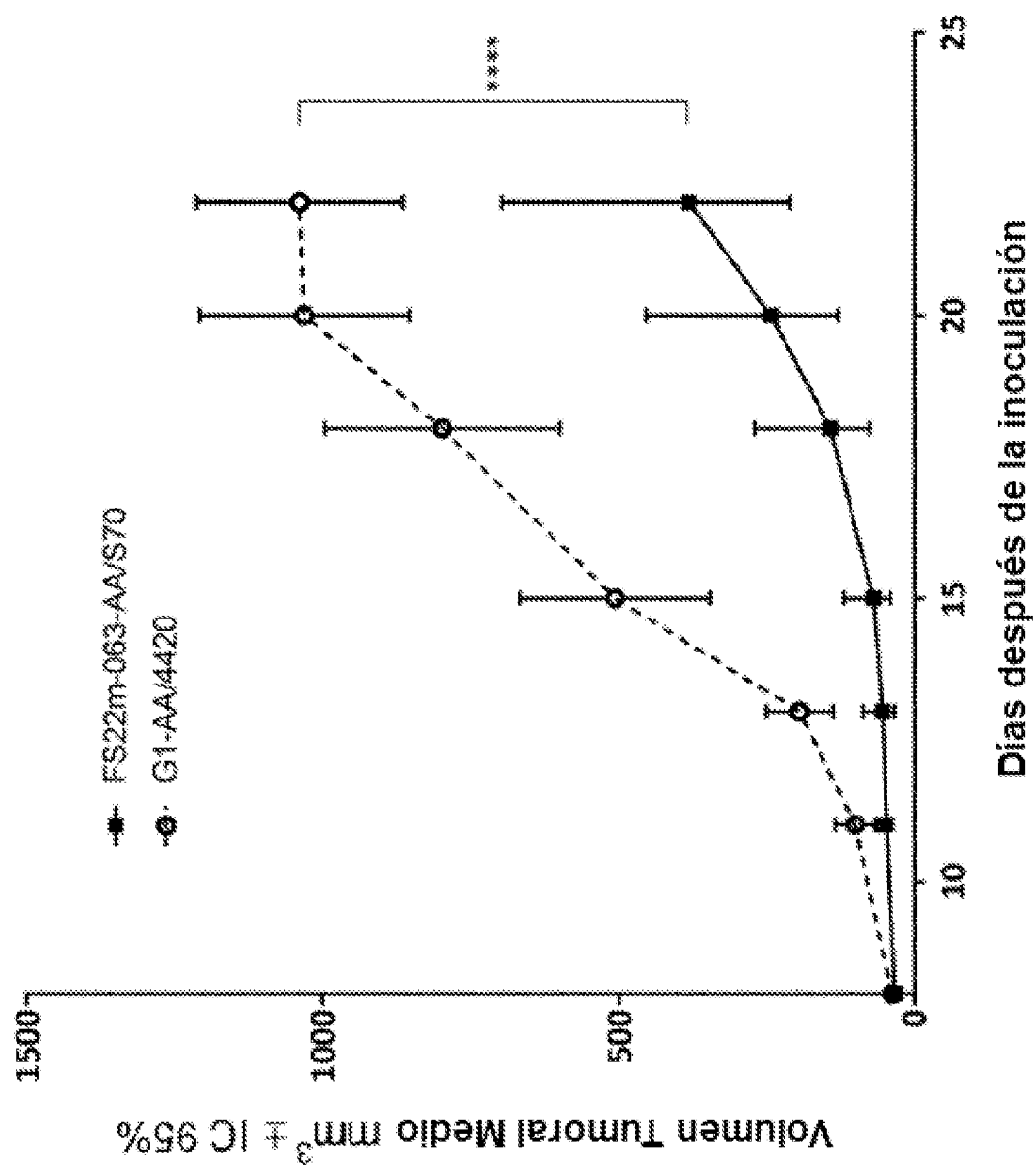


Figura 16

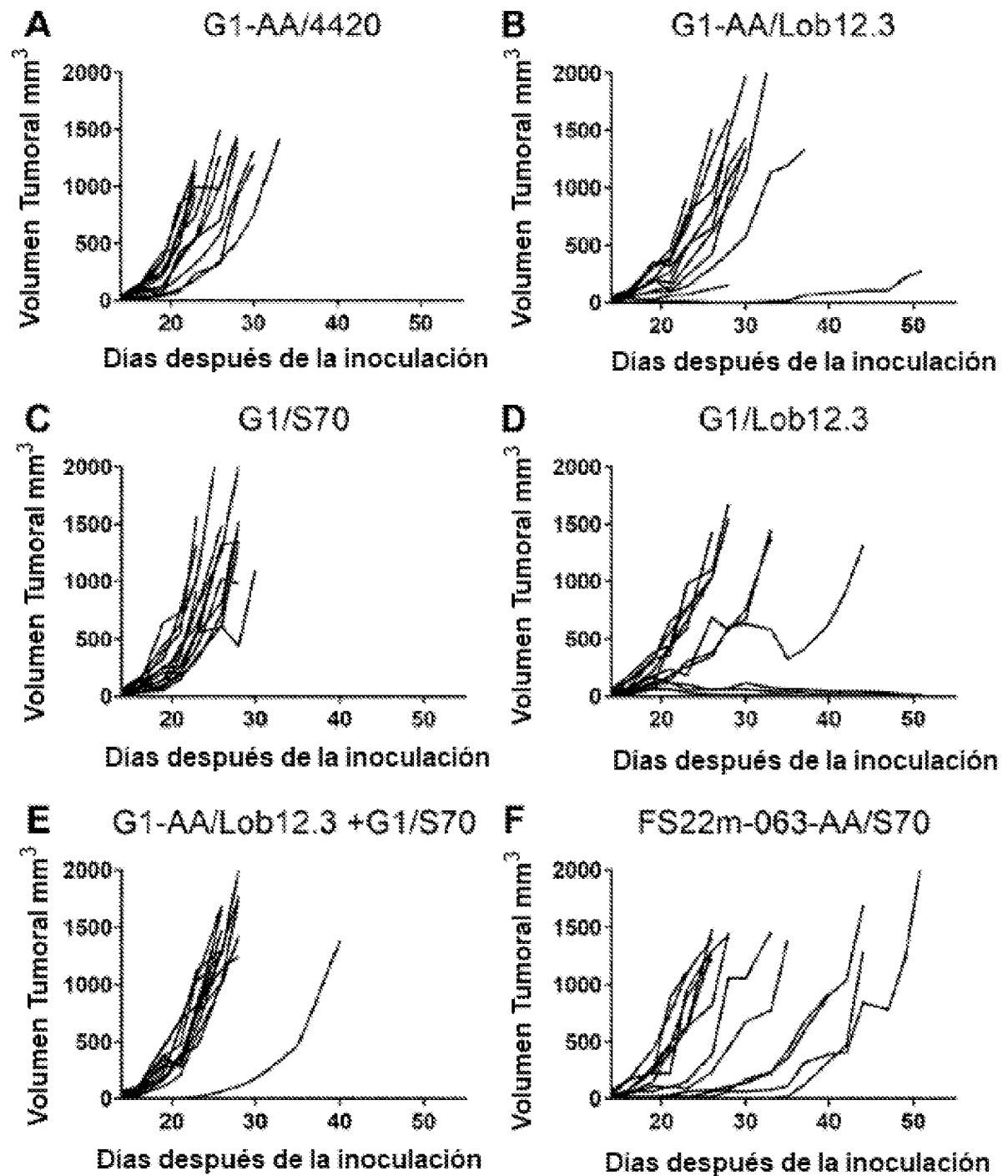


Figura 17

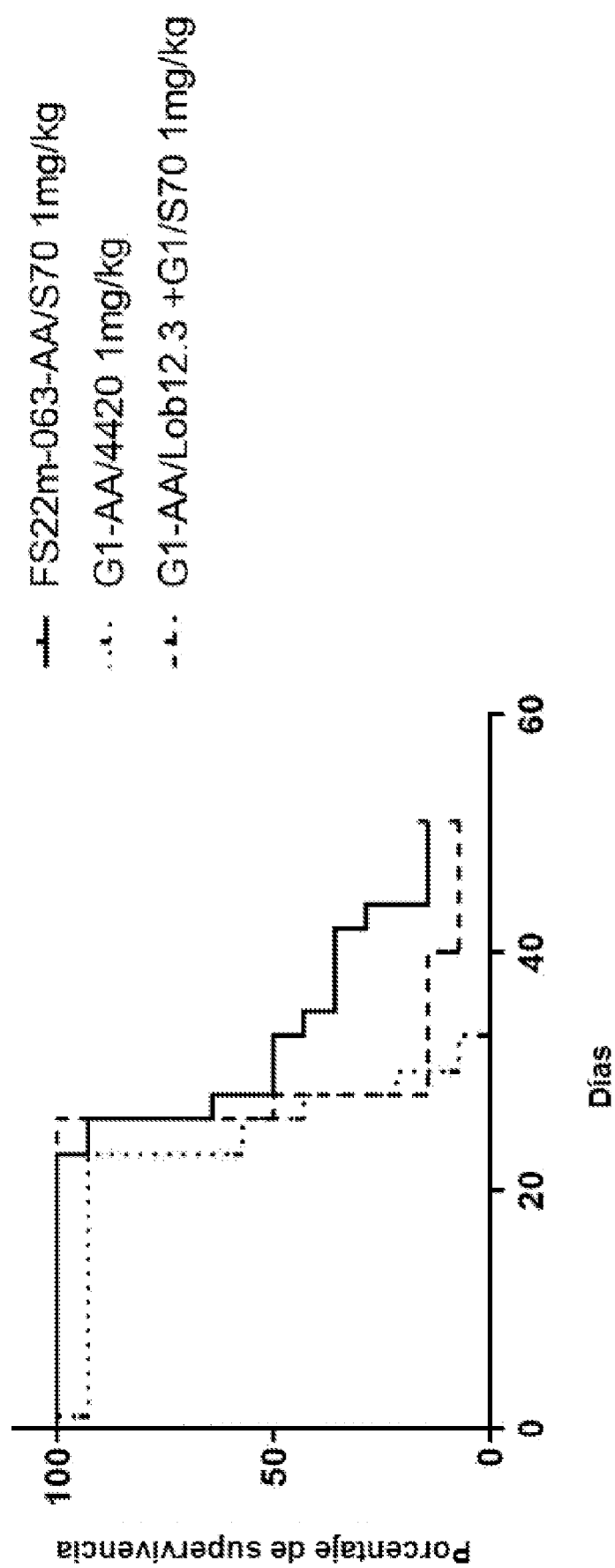


Figura 18

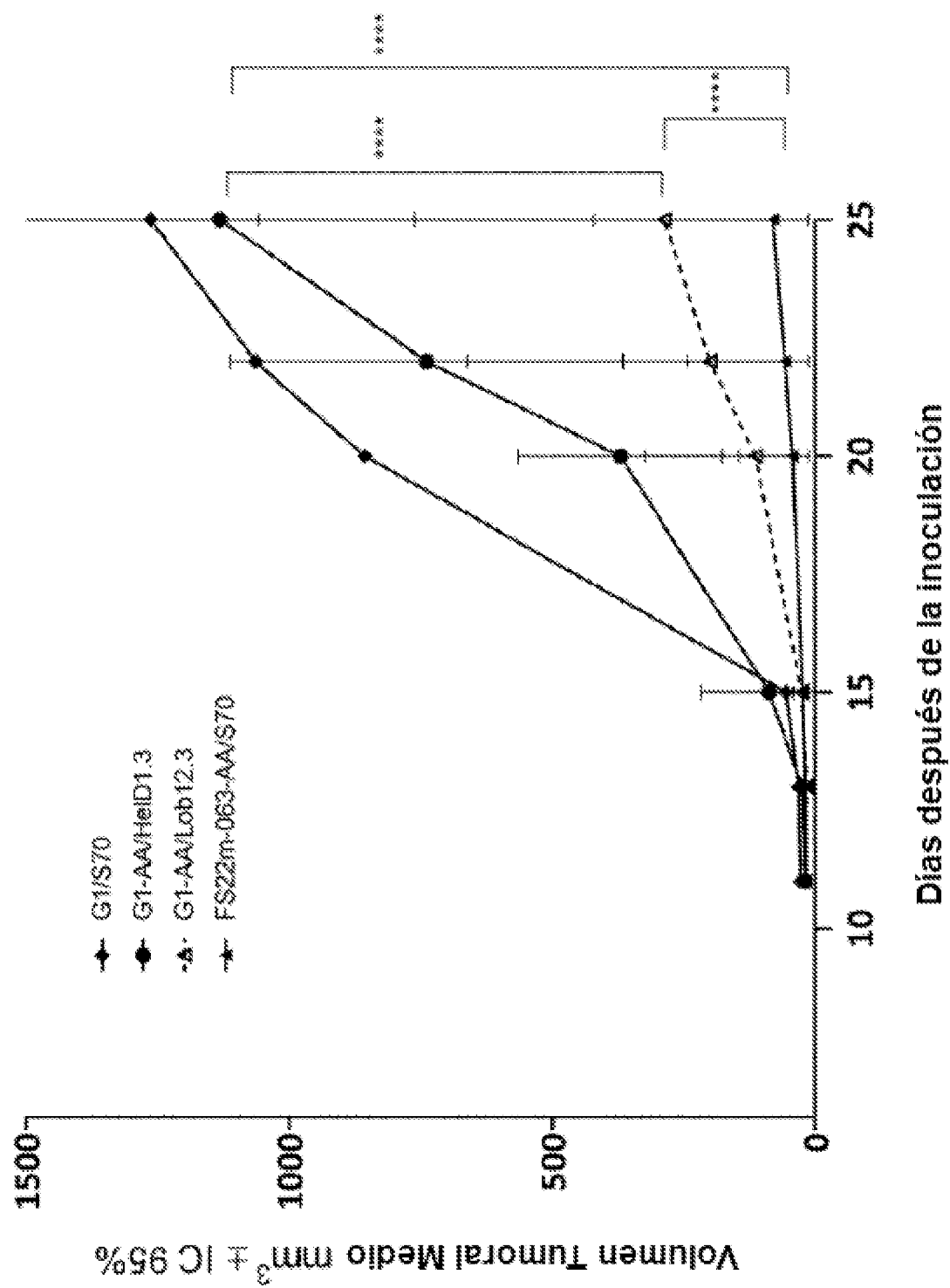


Figura 19

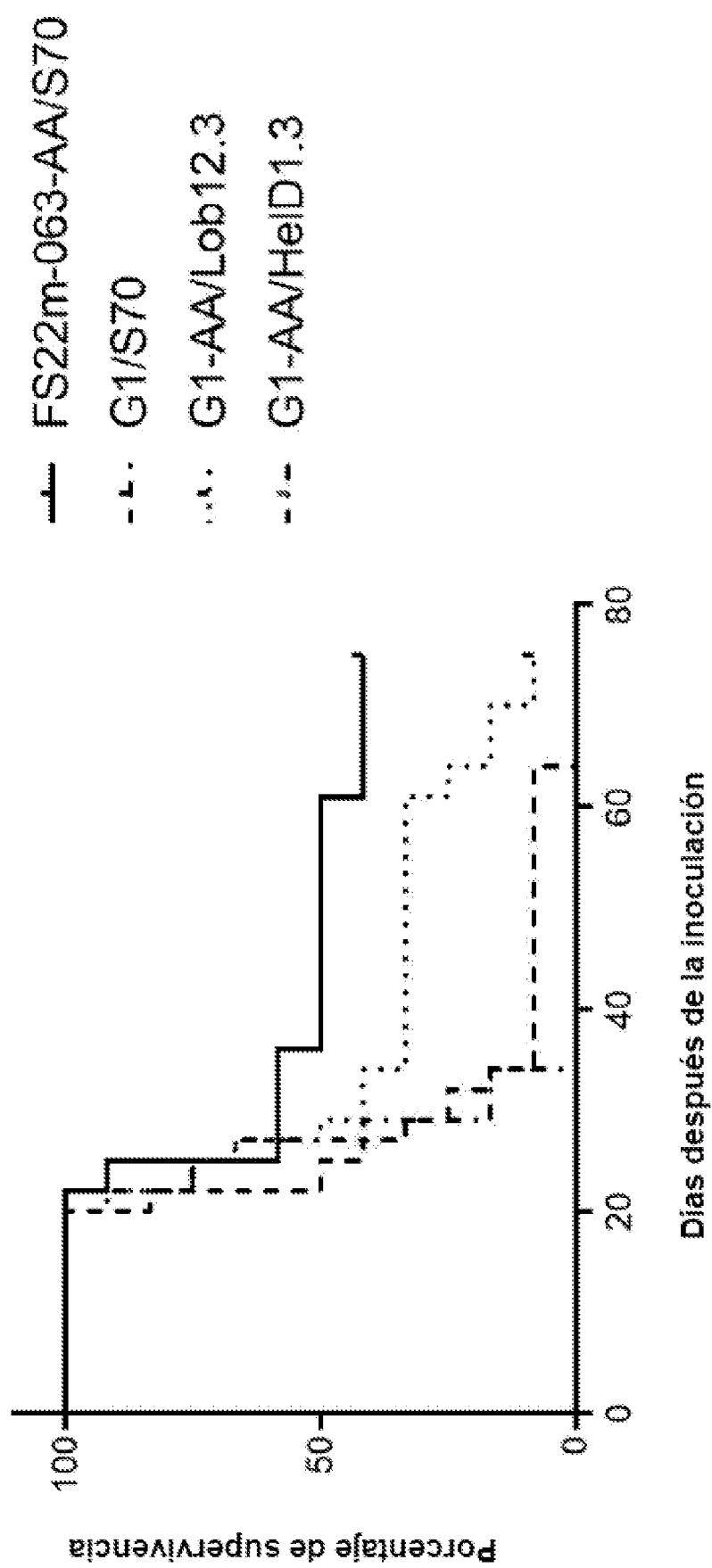


Figura 20

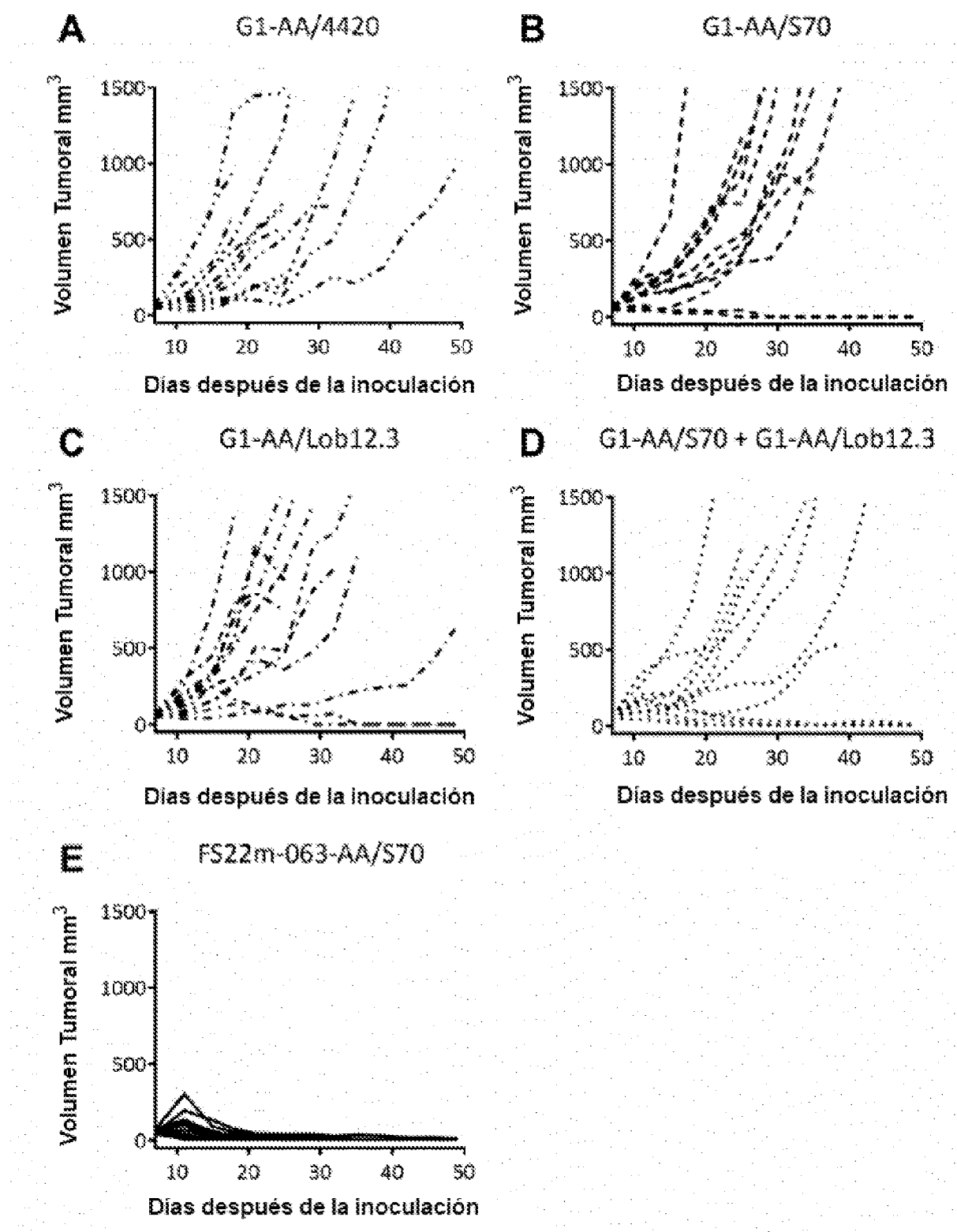


Figura 21

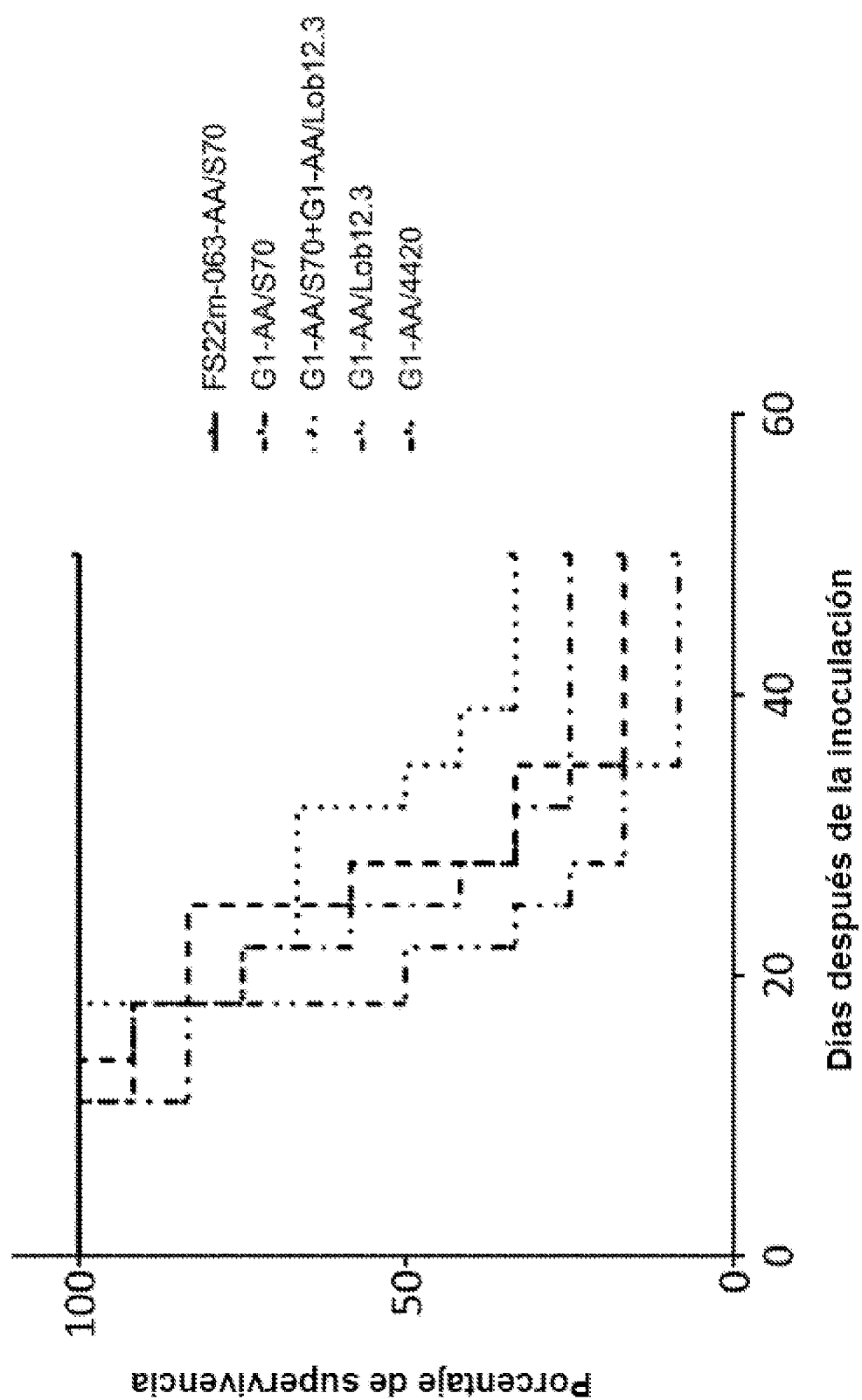


Figura 22

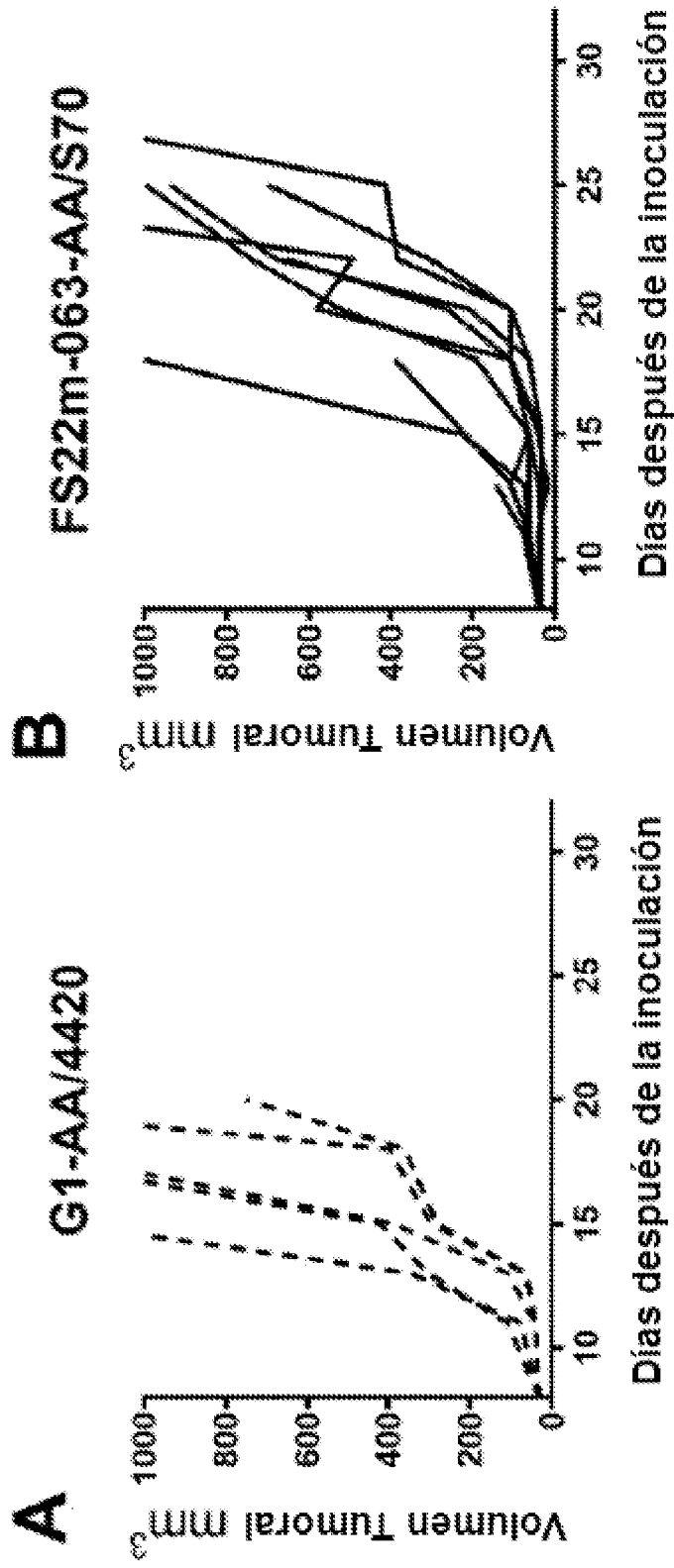


Figura 23

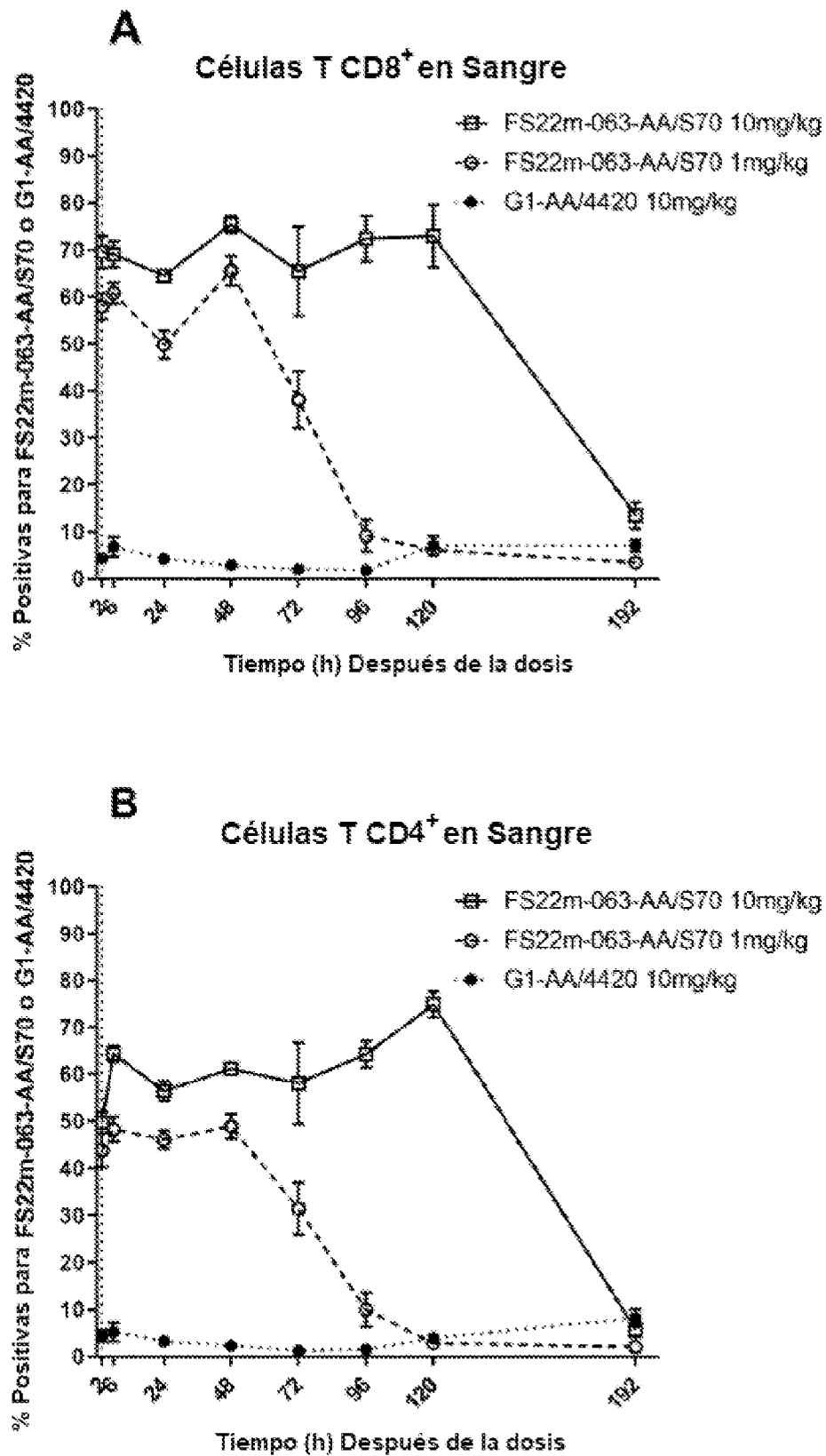


Figura 24

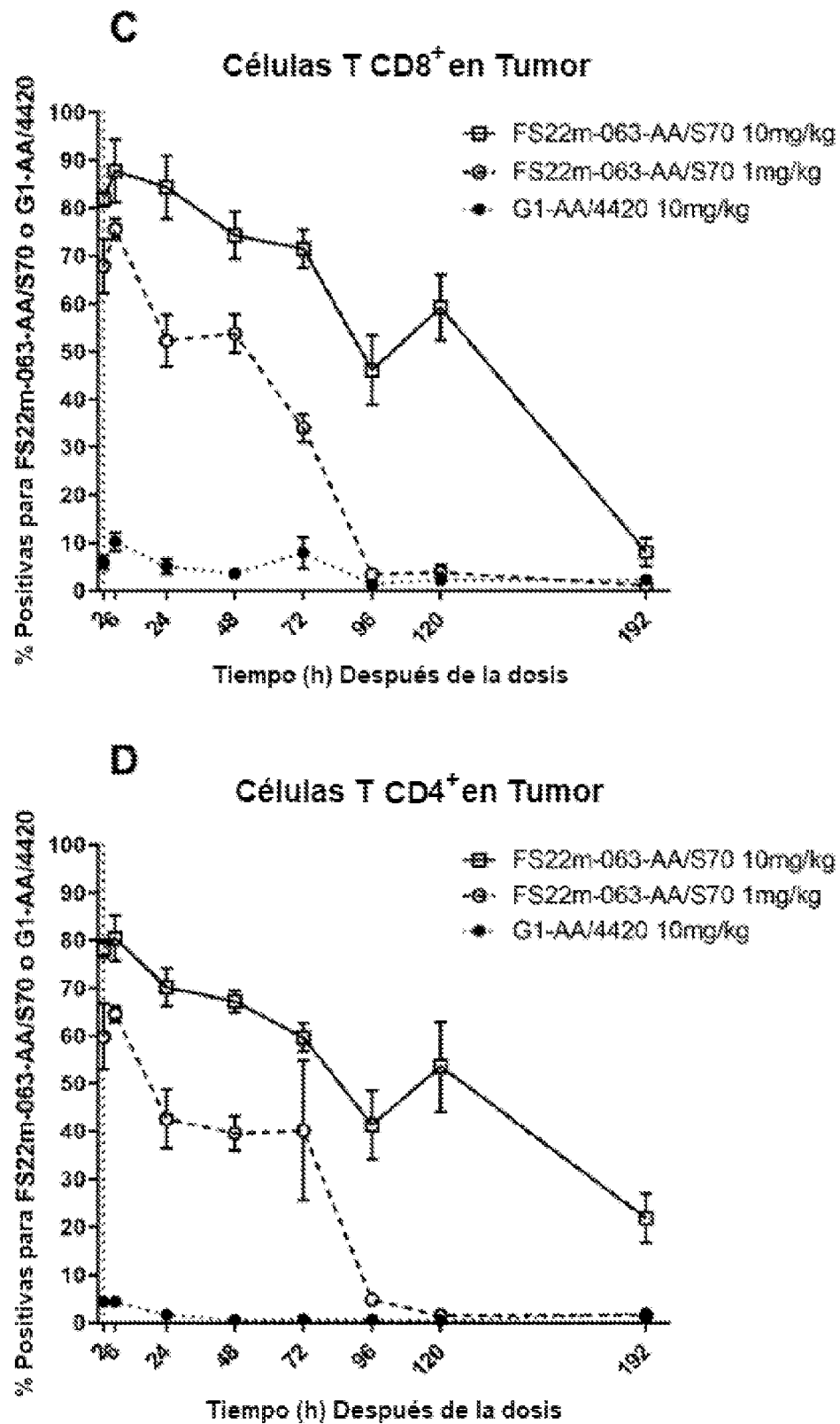


Figura 24 continuación

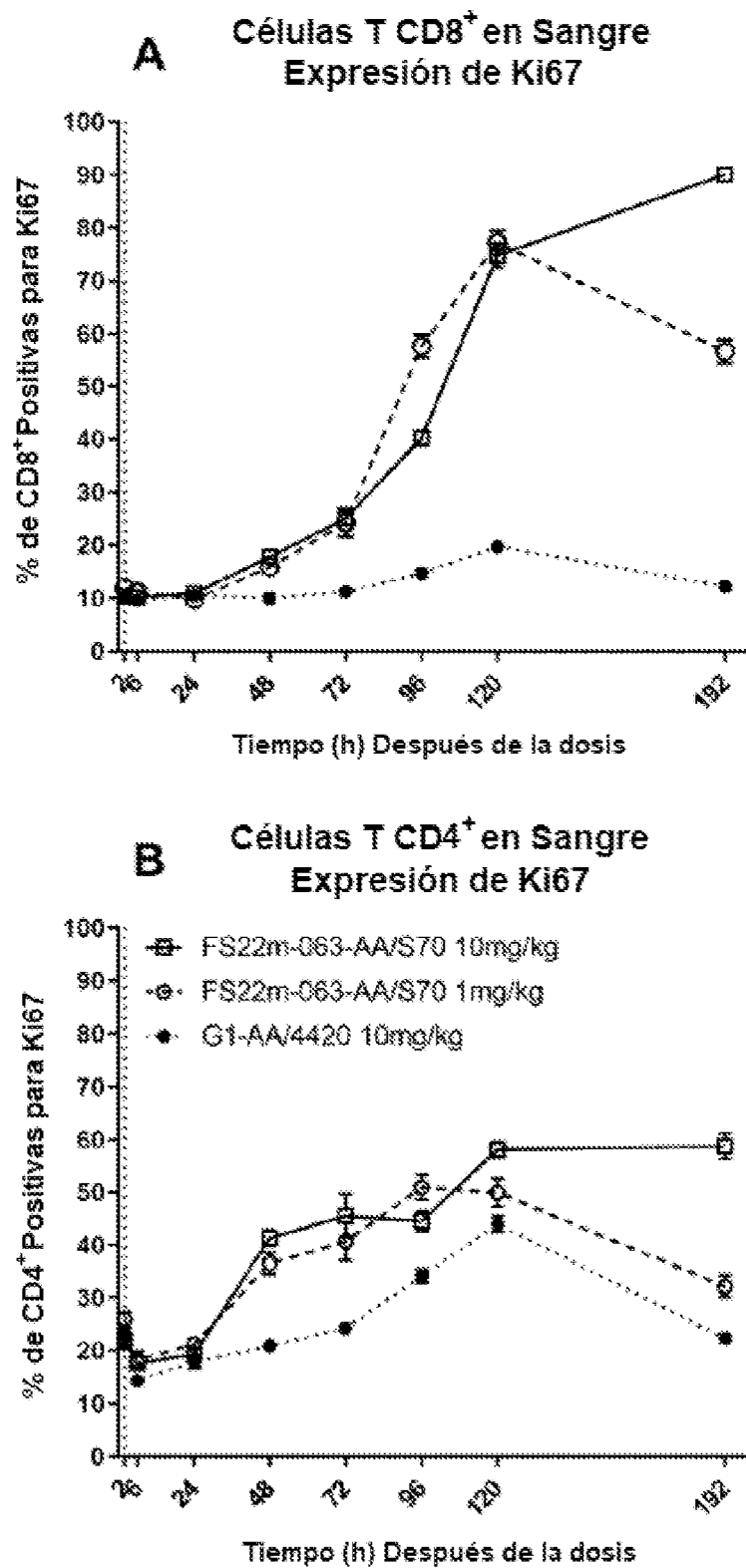


Figura 25

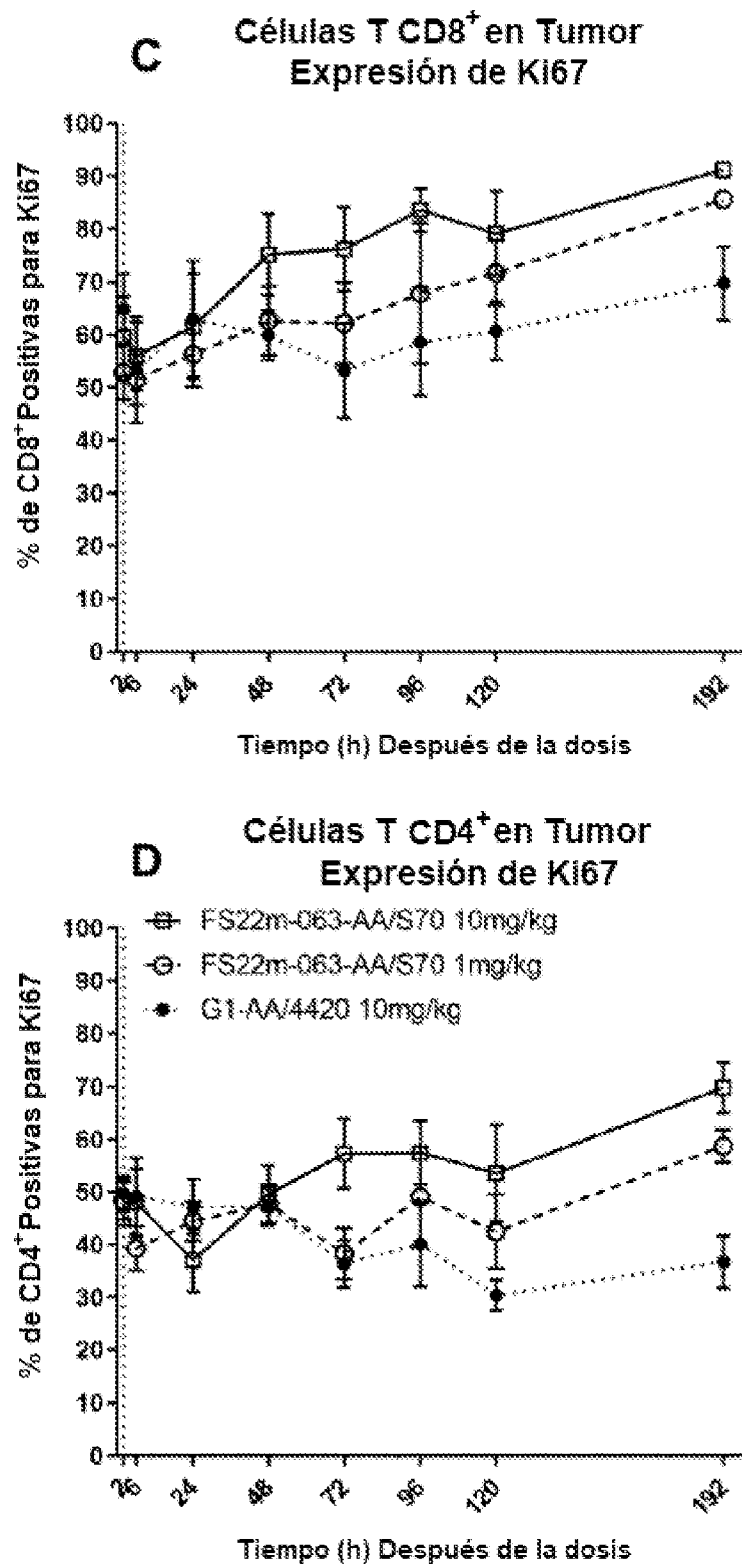


Figura 25 continuación

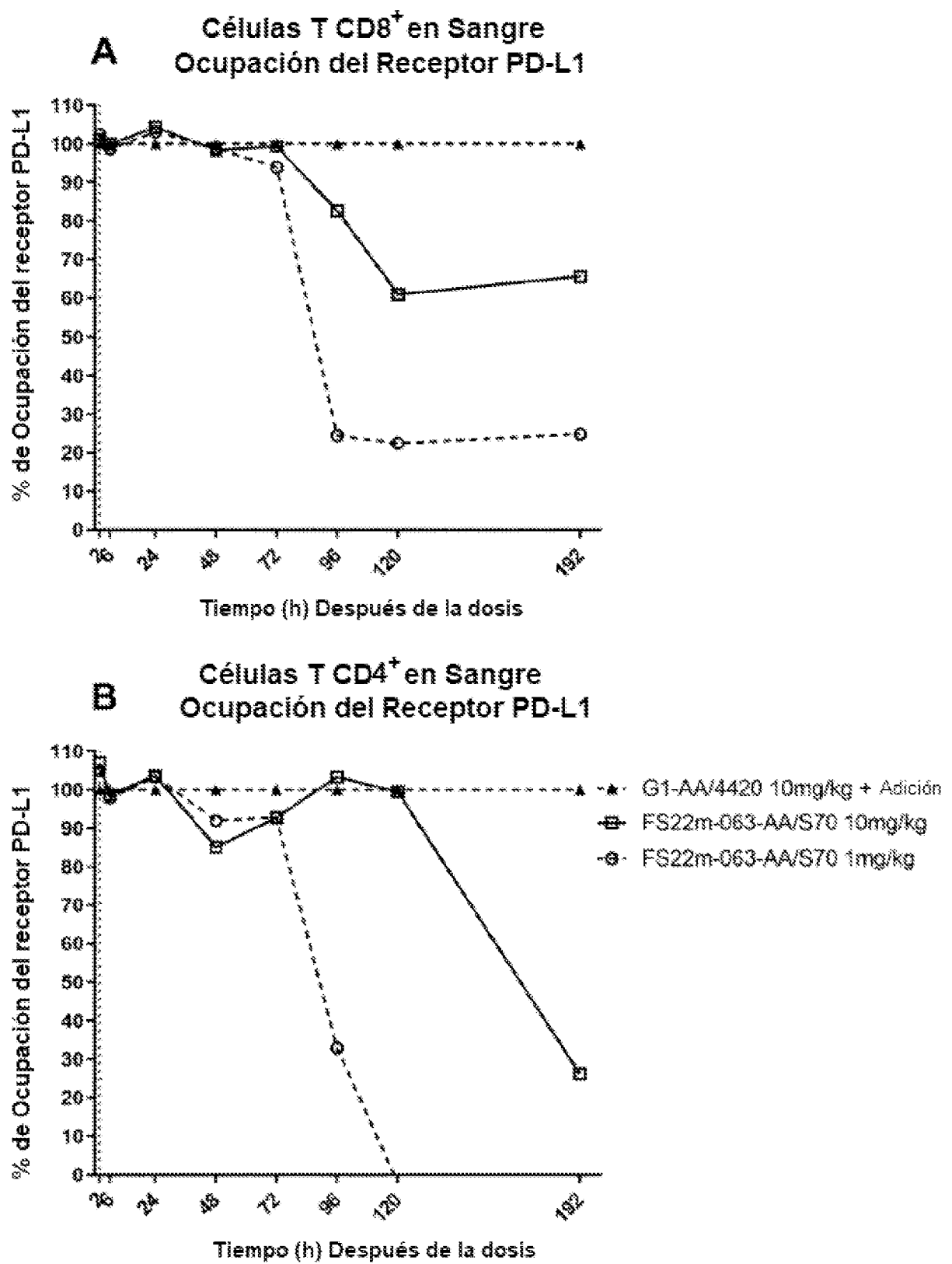
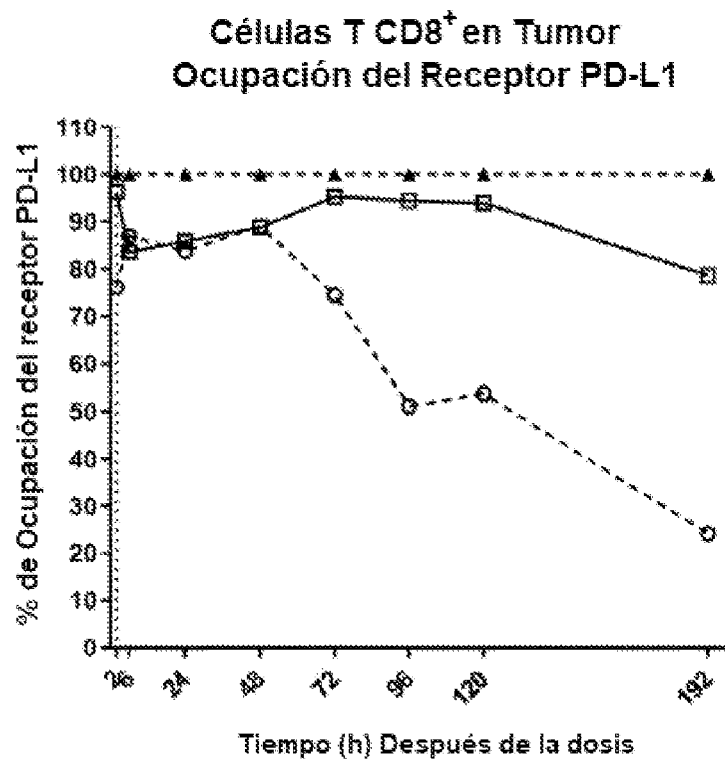


Figura 26

C



D

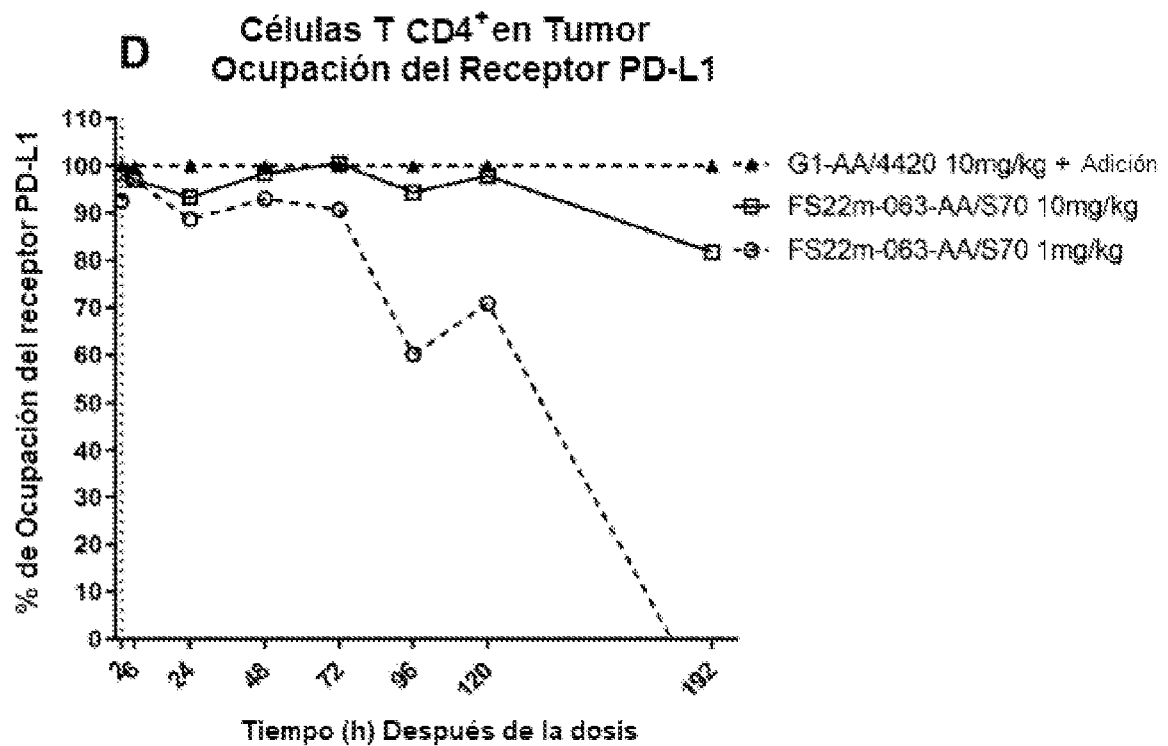


Figura 26 continuación

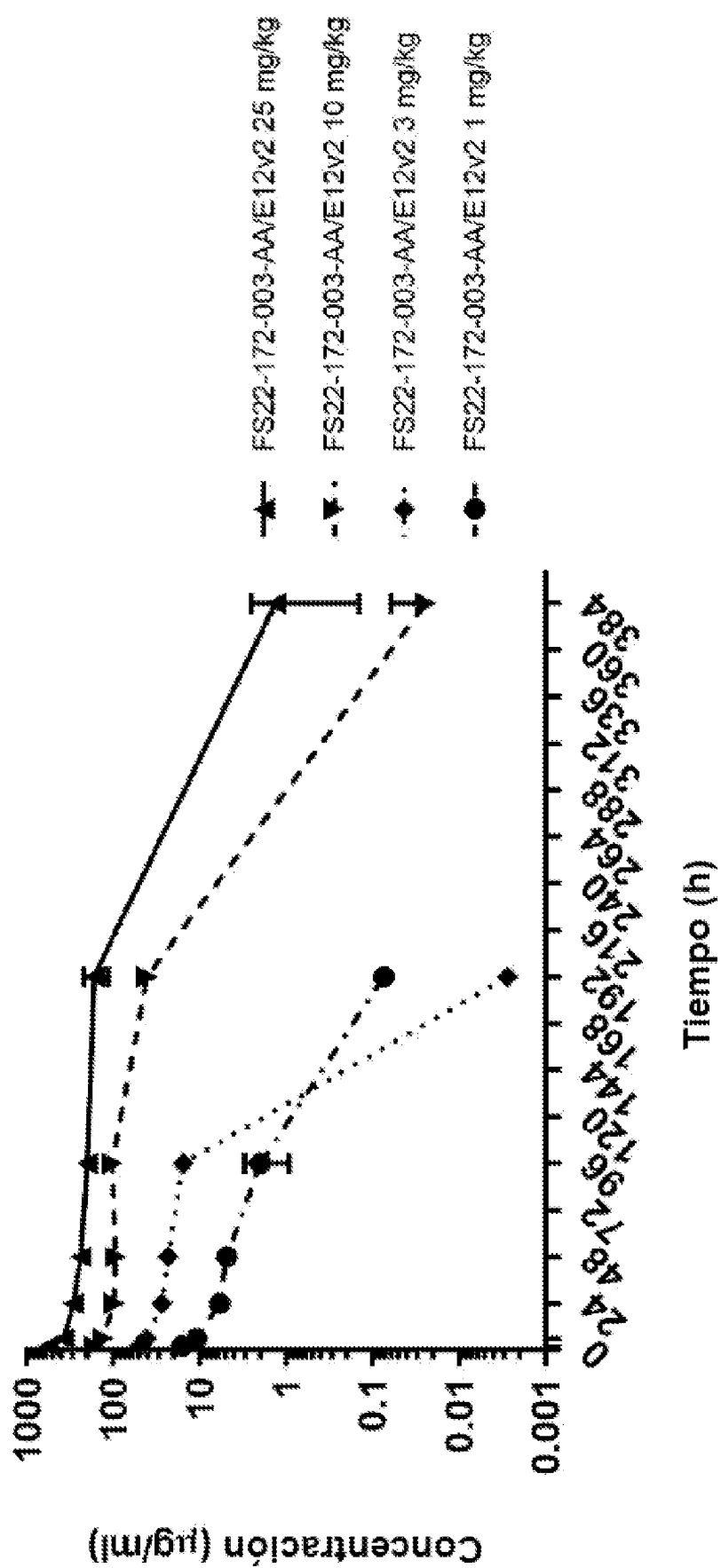


Figura 27

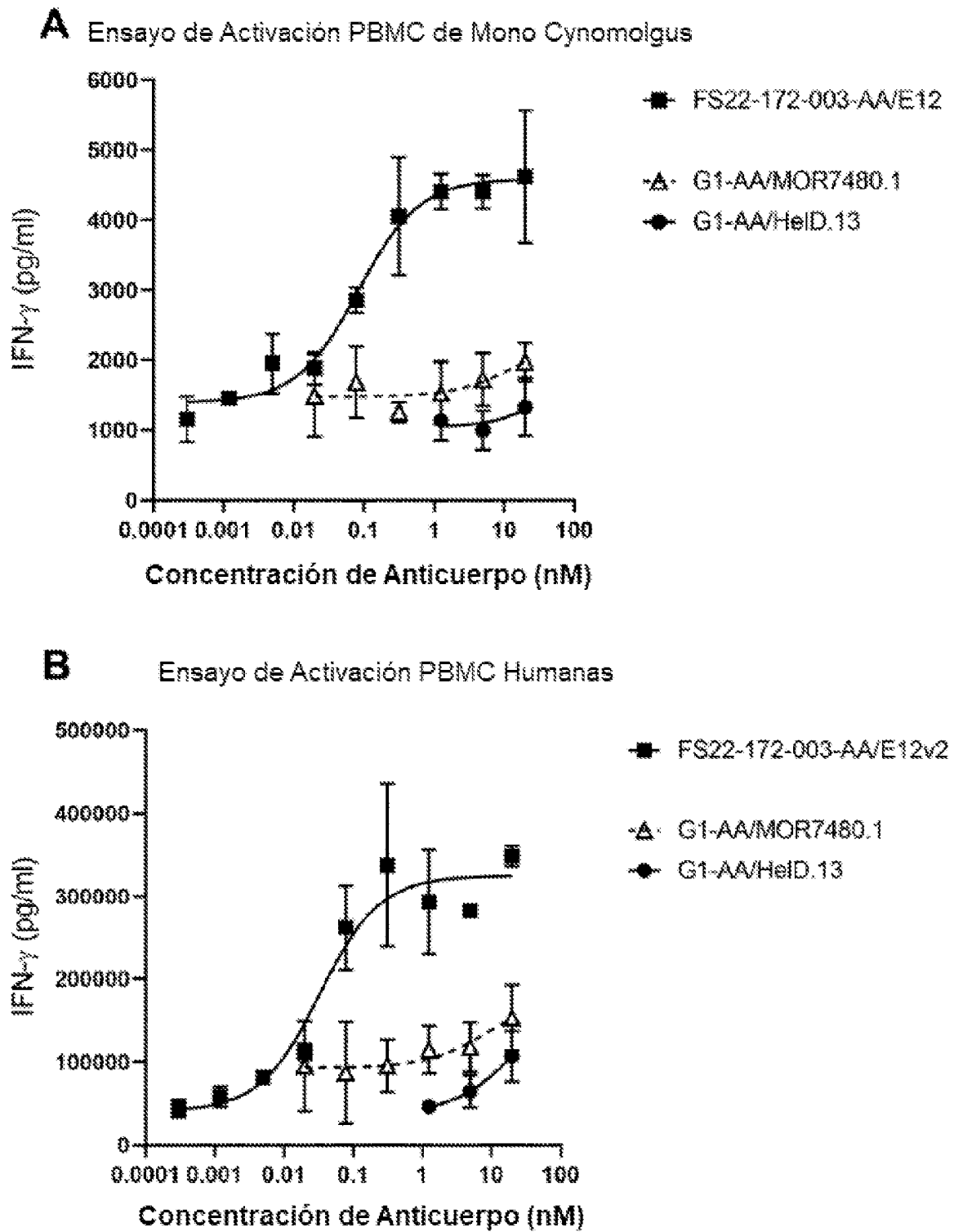


Figura 28