

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 272**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2017** **PCT/NL2017/050634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2018** **WO18056821**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2017** **E 17785041 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** **EP 3515951**

54 Título: **Moléculas de unión que modulan una actividad biológica expresada por una célula**

30 Prioridad:

23.09.2016 EP 16190499

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

08.10.2024

73 Titular/es:

MERUS N.V. (100.0%)
Uppsalalaan 17,3e en 4e verdieping
3584 CT Utrecht, NL

72 Inventor/es:

GEUIJEN, CECILIA ANNA WILHELMINA;
THROSBY, MARK;
DE KRUIF, CORNELIS ADRIAAN;
KLOOSTER, RINSE;
TACKEN, PAULUS JOHANNES y
LOGTENBERG, TON

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 981 272 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 unión que modulan una actividad biológica expresada por una célula

La invención se refiere al campo de las moléculas de unión. En particular se refiere al campo de los anticuerpos biespecíficos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades que implican células aberrantes. Más en particular se refiere a anticuerpos biespecíficos que se unen a una parte extracelular de PD-L1 y a un miembro de la superfamilia de receptores de TNF CD137, y de este modo modulan una actividad biológica expresada por una célula.

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, a pesar de los numerosos avances que se han realizado en el tratamiento de la enfermedad y del mayor conocimiento de los acontecimientos moleculares que conducen al cáncer. Es la segunda causa de muerte en el mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el cáncer fue responsable de 8.8 millones de muertes en 2015. A nivel mundial, casi 1 de cada 6 muertes se debe al cáncer. El cáncer colorrectal (CRC), por ejemplo, es el tercero más frecuente en todo el mundo. En 2008, se diagnosticó a 1.23 millones de personas con la enfermedad. Es el segundo cáncer más frecuente en Europa, con unos 447,000 nuevos casos diagnosticados en 2012 (el 13 % del total). El cáncer colorrectal es la cuarta causa más frecuente de muerte por cáncer, se estima que es responsable de 608.000 muertes (148.000 en la UE) al año. Aunque se han desarrollado algunos tratamientos nuevos para el CRC, muchos no han superado las pruebas clínicas; el CRC metastásico sigue siendo en gran medida incurable.

Tradicionalmente, la mayor parte del descubrimiento de fármacos contra el cáncer se ha centrado en agentes que bloquean funciones celulares esenciales y matan las células en división. Sin embargo, en los casos de cáncer avanzado, por muy agresiva que sea su aplicación, incluso hasta el punto de que los pacientes sufren efectos secundarios del tratamiento que ponen en peligro su vida, la quimioterapia rara vez produce una curación completa. En la mayoría de los casos, los tumores de los pacientes dejan de crecer o se reducen temporalmente (lo que se conoce como remisión) sólo para empezar a proliferar de nuevo, a veces más rápidamente (lo que se conoce como recaída), y volverse cada vez más difíciles de tratar. Más recientemente, el enfoque del desarrollo de fármacos contra el cáncer se ha movido de la quimioterapia citotóxica general hacia las terapias citostáticas dirigidas con menos toxicidad. El tratamiento del cáncer avanzado se ha validado clínicamente en la leucemia y en algunos otros tipos de cáncer. Sin embargo, en la mayoría de los carcinomas, los enfoques dirigidos siguen sin ser lo bastante eficaces para abolir por completo el cáncer en la mayoría de los pacientes. El melanoma es otro ejemplo de cáncer muy frecuente. Cuando la detección no es lo suficientemente temprana, es probable que el cáncer haga metástasis, estadio en el que es muy difícil de tratar. Se ha mostrado que los tratamientos de intervención inmunitaria son eficaces al menos para algunos de los pacientes con melanoma metastásico. El cáncer de pulmón de células no pequeñas es un tipo de cáncer que rara vez se descubre en un estadio lo bastante temprano como para cirugía. También estos tipos de cáncer se han tratado con éxito con tratamientos de intervención inmunitaria.

El direccionamiento de los cánceres se ha logrado utilizando una variedad de métodos diferentes que incluyen por ejemplo moléculas pequeñas dirigidas hacia las proteínas de señalización de las cuales depende el cáncer para supervivencia y/o crecimiento; las vacunas con proteínas específicas del tumor; terapias celulares con células inmunitarias que destruyen activamente las células tumorales y anticuerpos que dirigen moléculas citotóxicas al tumor; interfieren con la señalización y/o (re)dirigen el sistema inmunitario del huésped hacia las células tumorales. Los anticuerpos monoclonales que bloquean los ejes CTLA-4 o PD-1 han mostrado inducir respuestas clínicas duraderas en un subconjunto de pacientes con melanoma, NSCLC, carcinoma de células renales y carcinoma urotelial.

La presente invención proporciona medios y métodos novedosos para (re)dirigir componentes del sistema inmunitario. La invención también se refiere a medios y métodos para modular una actividad biológica expresada por las células.

Resumen de la invención

La presente invención es como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

La invención proporciona un método para estimular la actividad de CD 137 como el miembro de la superfamilia de receptores de TNF en una célula que comprende proporcionar una primera y una segunda célula de la cual la primera célula tiene dicho CD137 como miembro en la membrana celular y dicha segunda célula tiene PD-L1 como una segunda proteína de membrana en la membrana celular, el método comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo biespecífico que comprende dos dominios variables, en los que un dominio variable comprende un primer sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de CD137 y otro dominio variable comprende un segundo sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de PD-L1, estimulando de esta manera la actividad de CD137, en dicha primera célula, en la que dicho anticuerpo biespecífico se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto, y en el que el método no comprende el tratamiento en un cuerpo humano o animal. En algunas realizaciones, dicho método es un método in vitro.

Dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF es CD137. Dicha segunda proteína de membrana es PD-L1.

La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto. Dicho anticuerpo biespecífico comprende un sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de CD137 en una primera célula y un segundo sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de PD-L1 en una segunda célula, estimulando de esta manera la actividad de CD137, en el que dicho anticuerpo biespecífico se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto

El anticuerpo biespecífico como se define en las reivindicaciones adjuntas comprende un sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de CD137 como el miembro de la superfamilia de receptores de TNF y un sitio de unión a antígeno que puede unir PD-L1 como el miembro de la familia B7. En algunas realizaciones los sitios de unión a antígeno de dicho anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención consisten en un sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de CD137 como el miembro de la superfamilia de receptores de TNF y un sitio de unión a antígeno que puede unir PD-L1 como el miembro de la familia B7. En algunas realizaciones dicho anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención no tiene más de dos sitios de unión a antígeno.

Un anticuerpo biespecífico como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLSELSIHWVRQAPGKGV EWMGGFY
PEDVEPIYARKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELNSLRSEDTAVYYCAAEGFDNYG
SGIRGNWFDPWGQGCTLVTVSS

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQSPGKGLEWMGSFY
PEDGETIYAQKFQGRITMTEDTSDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEGVGVIRG
NWFDPWGQGCTLVTVSS,

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTKLSMHWVRQAPGKGLEWMGGFE
PEDGETINAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDLRLGASY
YYSYMDVWGRGTMVTVSS,

o QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTTG VGVNWIRQPPGEALEWLALIYW
NDDTYYSPLKSRLTITKDTSKNQWLTMTNMDPVDATYYCAHEGIIGFLGGN WFDPWGQGCTLVTVSS y una
región variable de cadena ligera común que tiene la secuencia
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ

SGVPSRFGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQSYSTPPTFGQGTKVEIK. En una realización preferida la
cadena pesada comprende una región contante de un anticuerpo de IgG1, preferiblemente un anticuerpo de
IgG1 humano. En una realización preferida la región CH2 de dicha región contante de IgG1 está diseñada por
ingeniería para reducir la actividad de ADCC y/o CDC del anticuerpo. En una realización preferida la región
CH2 comprende una secuencia como se representa en la figura 2E. En una realización preferida la región CH3
del anticuerpo está diseñada por ingeniería para facilitar la heterodimerización de las cadenas pesadas. En una
realización preferida una cadena pesada comprende una secuencia como se representa en la figura 2F y otra
cadena pesada comprende una secuencia como se representa en la figura 2G.

También se proporciona un anticuerpo biespecífico como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto
para uso en el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad que implica células aberrantes tales como
cáncer o tiene una infección crónica con un virus o parásito, el método comprende administrar dicho anticuerpo
biespecífico al individuo que lo necesita.

La invención proporciona además un anticuerpo biespecífico como se define en el conjunto de reivindicaciones
adjunto, para uso en el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad que implica células aberrantes
tales como cáncer, o una infección crónica con un virus o parásito.

En una realización preferida el parásito es un parásito intracelular.

Además se proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un individuo contra una célula
aberrante en dicho individuo, el método comprende proporcionar (administrar a) dicho individuo un anticuerpo
biespecífico de la invención. La célula aberrante es preferiblemente una célula de cáncer, una célula infectada

por un virus, un parásito o una célula infectada por un parásito. En una realización preferida la célula es una célula de cáncer o una célula neoplásica.

Descripción detallada de la invención

La superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFRSF) es un grupo de receptores. Se caracterizan normalmente por la capacidad de unirse a factores de necrosis tumoral (TNF) a través de un dominio extracelular rico en cisteína. Con la excepción del factor de crecimiento nervioso (NGF), todos los TNF son homólogos al arquetipo TNF-alfa. En su forma activa, la mayoría de los receptores del TNF forman complejos triméricos en la membrana plasmática. De acuerdo con lo anterior, la mayoría de los receptores del TNF contienen dominios transmembrana (TMD) y se localizan en la membrana celular. Sin embargo, algunos se pueden escindir en formas solubles (por ejemplo TNFR1), y algunos carecen totalmente de TMD (por ejemplo DcR3). Un anticuerpo de la invención que se une a un miembro de la superfamilia de receptores del TNF se une a un miembro de la superfamilia unido a la membrana. Los miembros que existen sólo en formas que no están asociadas con la membrana celular no están dentro del alcance de la presente invención.

Los receptores del TNF están implicados en la señalización hacia el interior de la célula tras la unión del ligando del receptor. Algunos receptores requieren proteínas adaptadoras específicas como TRADD, TRAF, RIP y FADD para la señalización en dirección descendente. Se conocen varios miembros de la superfamilia TNF. Estos incluyen el receptor 1 del factor de necrosis tumoral; receptor 2 del factor de necrosis tumoral; receptor beta de la linfotoxina; OX40; CD40; receptor Fas; CD27; CD30; CD137; receptor de muerte 3; receptor de muerte 4; receptor de muerte 5; receptor de muerte 6; RANK; TROY; receptor BAFF; antígeno de maduración de células B (BCMA) y una proteína activadora transmembrana y moduladora del calcio que interactúa con el ligando de la ciclofilina (TACI).

El miembro de la superfamilia de receptores de TNF de la presente invención es CD137.

El CD137 se puede expresar por células T activadas. También se encuentra en otras células tales como células dendríticas, células destructoras naturales, granulocitos y células de la pared de los vasos sanguíneos en sitios de inflamación. La proteína es conocida por su actividad coestimuladora para la activación de las células T. El CD137 se conoce bajo una serie de diferentes nombres tales como: TNFRSF9; Miembro 9 de la Superfamilia de Receptores de TNF; Miembro 9 de la Superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral; Homólogo del antígeno de células T 4-1BB; Receptor de Ligando 4-1BB; ILA de Antígeno de células T; Antígeno CD137; CDw137; ILA; Receptor Activado por Interleucina, Homólogo del Ratón Ly63; Inducido por Activación Linfocitaria (ILA); Homólogo del Ratón 4-1BB; Proteína Receptora 4-1BB; ILA de Antígeno de Células T; y 4-1BB. Ids externos para CD137 son HGNC: 11924; Entrez Gene: 3604; Ensembl: ENSG00000049249; OMIM: 602250; y UniProtKB: Q07011. CD137 es un receptor inducible más comúnmente regulado al alza en las células T CD8+ activadas. La señalización de CD137 mejora la función de las células T al activar NF- κ B [Arch et al, 1998]. Otros tipos de células inmunitarias que incluyen las células T CD4+, los monocitos, las células B, las subpoblaciones de células dendríticas (DC), los granulocitos y las células NK, pueden expresar CD137 a varios niveles [Shao et al, 2011]. En los monocitos, CD137 es inducible por activación con lipopolisacárido (LPS) e IL-1 β . En los linfocitos B, la expresión de CD137 es inducida por anticuerpos contra la inmunoglobulina de la superficie celular y por la transformación con EBV. En las DC, la ligadura de CD137 induce su maduración a través de la regulación al alza de las moléculas coestimuladoras de B7 (CD80 y CD86), además de mejorar su producción de citocinas inflamatorias (IL-6 e IL-12) y su supervivencia [Makkouk et al, 2015]. La función natural de la ligadura de CD137 en neutrófilos es el incremento de la fagocitosis de infecciones bacterianas y parasitarias. Además, la ligadura de CD137 bloquea las señales anti-apoptosis mediadas por los receptores IL-3/IL-5/GM-CSF en neutrófilos y eosinófilos in vitro, impidiendo de esta manera la acumulación de granulocitos [Simon, 2001; Vinay et al, 2011]. En las células no linfoides tales como los condrocitos, las células endoteliales y las células tumorales, la expresión de CD 137 es impulsada por la estimulación de citocinas tales como la IL-1 β para los condrocitos, las citocinas inflamatorias TNFalfa/IFN γ /IL-1 β para las células endoteliales e IFN γ para las células tumorales. El ligando que estimula el CD137 (CD137L) se expresa en las células presentadoras de antígeno activadas. CD137 existe en la membrana como monómeros y dímeros [Pollok et al, 1993]. El documento WO2016110584 describe anticuerpos biespecíficos dirigidos contra CD137xCD40.

La familia B7 comprende una serie de proteínas de superficie celular estructuralmente relacionadas, que se unen a receptores en los linfocitos que regulan las respuestas inmunitarias. La activación de los linfocitos se inicia mediante el acoplamiento de receptores de células T o receptores de células B específicos de antígeno en la superficie celular. Las señales suministradas adicionales simultáneamente por los ligandos B7 determinan la respuesta inmunitaria de estas células. Los miembros de la familia B7 suministran estas señales denominadas 'coestimuladoras' o 'coinhibidoras' a través de la familia de receptores CD28 en los linfocitos. La unión de los miembros de la familia B7 con los receptores costimuladores aumenta las respuestas inmunitarias, y la unión con los receptores coinhibidores atenúa las respuestas inmunitarias. Actualmente se considera que los siguientes miembros forman parte de esta familia: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), ligando costimulador inducible (ICOS-L), ligando 1 de muerte programada (PD-L1), ligando 2 de muerte programada (PD-L2), B7-H3 (CD276), B7-H4, B7-H5, B7-H6 y B7-H7. Los miembros de la familia B7 se expresan en tejidos linfoides y no linfoides. Los efectos de los miembros en la regulación de las respuestas inmunitarias se muestran en el desarrollo de

inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunitarias en ratones con mutaciones en los genes de la familia B7. La manipulación de las señales suministradas por los ligandos B7 ha mostrado su potencial en el tratamiento de la autoinmunidad, las enfermedades inflamatorias y el cáncer. El miembro de la familia B7 de la presente invención es PD-L1.

Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que se une a una parte extracelular de CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF y a una parte extracelular de PD-L1 como miembro de la familia B7 proporciona la ventaja de que se puede promover particularmente bien una respuesta inmunitaria deseada, ya que los miembros de la familia B7 suministran señales 'coestimuladoras' o 'coinhibidoras' a los linfocitos, aumentando o atenuando de esta manera una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, al dirigir a un miembro de la familia B7 es posible mejorar las señales estimuladoras y/o contrarrestar las señales inhibidoras, induciendo o mejorando de esta manera una respuesta inmunitaria deseada, por ejemplo contra células aberrantes.

PD-L1 es una proteína transmembrana de tipo 1 que desempeña una función en la supresión de una respuesta inmunitaria durante acontecimientos particulares tales como el embarazo, los aloinjertos de tejidos, las enfermedades autoinmunitarias y otros estados de enfermedad tales como la hepatitis. PD-L1 se expresa en varios tipos de cáncer, especialmente en NSCLC (Boland et al., 2013; Velcheti et al., 2014), melanoma, carcinoma de células renales, cáncer gástrico, hepatocelular, así como en varias leucemias y mieloma múltiple (Bernstein et al., 2014; Thompson et al., 2005). PD-L1 está presente en el citoplasma y la membrana plasmática de las células cancerosas, pero no todos los cánceres ni todas las células de un tumor expresan PD-L1 (Dong et al., 2002). Múltiples células del microambiente tumoral contribuyen a la supresión inmunitaria al regular al alza la expresión de PD-L1. Este efecto se denomina "resistencia inmunitaria adaptativa", porque el tumor se protege a sí mismo al inducir PD-L1 en respuesta al IFN- γ producido por las células T activadas (Sharma et al., 2017). PD-L1 también se puede regular por oncogenes, este mecanismo se conoce como resistencia inmune inherente (Akbay et al., 2013). Dentro del microambiente tumoral, PD-L1 también se expresa en células mieloides y células T activadas (Tumeh et al., 2014). La expresión de PD-L1 es inducida por múltiples moléculas proinflamatorias, que incluyen los tipos I y II de IFN- γ , TNF- α , LPS, GM-CSF y VEGF, así como las citocinas IL-10 e IL-4, el IFN- γ es el inductor más potente (Kondo et al., 2010; Sznol y Chen, 2013).

La unión de PD-L1 a PD-1 o B7.1 (CD80) transmite una señal inhibidora que reduce la proliferación de las células T que expresan PD-1. Se considera que PD-1 puede controlar la acumulación de células T específicas de antígenos extraños a través de la apoptosis. Se considera que PD-1 puede controlar la acumulación de células T específicas de antígenos extraños mediante la apoptosis. PD-L1 se expresa en diversas células cancerosas y se considera que la expresión de la misma es responsable al menos en parte de la atenuación de la respuesta inmunitaria contra la célula cancerosa. PD-L1 es un miembro de la familia de proteínas B7 y se conoce bajo una variedad de otros nombres tales como Molécula CD274; Antígeno CD274; Homólogo 1 de B7; Ligando 1 de PDCD1; PDCD1LG1; PDCD1L1; B7H1; PDL1; Ligando 1 de Muerte Celular Programada; Ligando 1 de Muerte Programada; B7-H1; y B7-H. Los Id externos para CD274 son HGNC: 17635; Entrez Gene: 29126; Ensembl: ENSG00000120217; OMIM: 605402; UniProtKB: Q9NZQ7.

PD-L2 es un segundo ligando para PD-1. El acoplamiento de PD-1 por PD-L2 inhibe la proliferación mediada por el receptor de células T (TCR) y la producción de citocinas por las células T CD4⁺. A bajas concentraciones de antígeno, la unión PD-L2/PD-1 inhibe las señales B7-CD28. A altas concentraciones de antígeno, la unión PD-L2/PD-1 reduce la producción de citocinas. La expresión de PD-L se regula al alza en las células presentadoras de antígeno por el tratamiento con interferón gamma. Se expresa en algunos tejidos normales y en una variedad de tumores. Se considera que PD-L1 y PD-L2 tienen funciones que se solapan y regulan las respuestas de las células T. La proteína se conoce bajo una serie de nombres tales como Ligando 2 de la Muerte Celular Programada 1; Molécula de Células Dendríticas B7; Ligando 2 de la Muerte Programada; Butirofilina B7-DC; Ligando 2 de PDCD1; Ligando 2 de PD-1; PDCD1L2; B7-DC; CD273; B7DC; PDL2; Ligando 2 de PD-1; Antígeno CD273; BA574F11.2; y Btdc. Los Id externos para PD-L2 son HGNC: 18731; Entrez Gene: 80380; Ensembl: ENSG00000197646; OMIM: 605723; y UniProtKB: Q9BQ51.

La proteína de Muerte Celular Programada 1 (PD-1) es un receptor de superficie celular que pertenece a la familia de receptores CD28 y se expresa en células T y células pro-B. Actualmente se sabe que PD-1 se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-1, que funciona como un punto de control inmunitario, desempeña una función importante en la regulación del sistema inmunitario al inhibir la activación de las células T, lo que a su vez reduce la autoinmunidad y promueve la autotolerancia. Se considera que el efecto inhibidor de PD-1 se consigue a través de un mecanismo doble de promoción de la apoptosis (muerte celular programada) en las células T específicas de antígeno de los ganglios linfáticos al tiempo que reduce la apoptosis en las células T reguladoras (células T supresoras). La PD-1 también se conoce bajo una serie de diferentes alias tales como PDCD1; Muerte Celular Programada 1; Susceptibilidad al Lupus Eritematoso Sistémico 2; Proteína PD-1; HPD-1; PD1; Proteína de Muerte Celular Programada 1; Antígeno CD279; CD279; HPD-L; HSLE1; SLEB2; y PD-1. Los Id externos para PD-1 son HGNC: 8760; Entrez Gene: 5133; Ensembl: ENSG00000188389; OMIM: 600244; y UniProtKB: Q15116. Las nuevas clases de fármacos que bloquean la actividad de PD-1, los inhibidores de PD-1, activan el sistema inmunitario para que ataque a los tumores y, por tanto, se utilizan con éxito para tratar algunos tipos de cáncer.

La referencia a los identificadores de secuencia se hace para identificar la proteína a la que se dirige. Un anticuerpo biespecífico de la invención también reconoce al menos algunas variantes de la misma tales como variantes alélicas, variantes de empalme y variantes mutantes de la misma siempre que el epítipo reconocido por el dominio variable respectivo del anticuerpo no se haya visto afectado. Algunos de los nombres alternativos pueden o no haberse utilizado también para referirse a otras proteínas. Los nombres se dan sólo con fines de referencia. Un anticuerpo de la invención se une a la proteína como se expresa en las células. También se puede unir a variantes de la proteína siempre que el epítipo al que se une la molécula de unión esté disponible. Por lo tanto las variantes de empalme o las proteínas mutantes (si las hay) también se unirán siempre que el epítipo esté disponible. El hecho de que la molécula de unión se una a la proteína indicada significa que se puede unir a la proteína como propiedad y no implica que la molécula de unión esté realmente unida a la diana, aunque puede estarlo. Tampoco significa que el anticuerpo no se una a otras proteínas. Dicha reactividad cruzada no se conoce en la actualidad para un anticuerpo de la presente invención; sin embargo, no se excluye expresamente que pueda existir dicha reactividad cruzada.

El anticuerpo biespecífico de la invención se une a dos dianas. Los anticuerpos biespecíficos tienen sitios de unión (sitios de unión a antígeno) con los que se unen las dianas. El anticuerpo biespecífico comprende dos o más dominios que tienen un sitio de unión para la diana (antígeno), preferiblemente un sitio de unión por dominio. Dichos dominios son dominios variables de anticuerpos. Los dominios variables de anticuerpos han sido objeto de mucha investigación. Se fabrican muchas variantes que se asemejan a los dominios variables o a partes de los mismos que conservan la especificidad de unión de un dominio variable normal. En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de dichas variantes.

En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico de la invención es un conjugado o una proteína de fusión. En el caso de los anticuerpos, la tecnología de fabricación de anticuerpos multiespecíficos ha progresado hasta incluir también anticuerpos biespecíficos que tienen la misma estructura general que un anticuerpo monoespecífico normal, pero en los que cada uno de los dos brazos del anticuerpo se une a una diana diferente.

Como se utiliza en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a dos o más moléculas que se han unido covalentemente, opcionalmente mediante una región de ligamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un conjugado es una primera fracción proteica o no proteica unida a una segunda fracción proteica o no proteica mediante una región de ligamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención comprende o consiste en dos o más anticuerpos que se han unido covalentemente. Un conjugado no se limita a una primera y segunda fracción, sino que en algunas realizaciones también puede tener una tercera, cuarta o más fracciones unidas por otras regiones de ligamiento. Como se describe en otras partes de esta solicitud, los ejemplos de fracciones proteicas incluyen, pero no se limitan a: un polipéptido, un peptidomimético o un anticuerpo (o parte, derivado o análogo de anticuerpo, como se describe en otras partes en la solicitud). Los ejemplos de fracciones no proteicas incluyen, pero no se limitan a los aptámeros. Se pueden utilizar numerosos tipos de ligador, y el ligador se seleccionará para que sea apropiado de acuerdo con los tipos de moléculas en el conjugado y de las propiedades deseadas del ligador (longitud, flexibilidad, resistencia a la actividad proteasa y otras características similares). Dichos ligadores pueden comprender nucleótidos, polipéptidos o un material sintético adecuado. Por ejemplo, un ligador puede ser un ligador de péptido flexible. En ciertas realizaciones, el ligador puede ser un ligador escindible, que permite que las partes del conjugado se separen entre sí. En otras realizaciones, un ligador de péptido puede ser un ligador helicoidal. Se conocen varios ejemplos y kits para unir proteínas y otras moléculas en la técnica.

Como se utiliza en el presente documento, el término "proteína de fusión" se refiere a una proteína que comprende dos o más polipéptidos o proteínas que se han unido a nivel del ADN por recombinación y se expresan juntos como un único polipéptido. Una proteína de fusión también puede comprender una región de ligamiento de péptido también codificada por el ADN y expresada junto con la proteína de fusión. Un ligador de péptido que forme parte de una proteína de fusión se puede diseñar para que tenga características particulares tales como flexibilidad, hidrofiliidad, resistencia a las proteasas, capacidad de escisión, etc. Todas estas propiedades se pueden diseñar dentro de la secuencia de ADN y los métodos para diseñar ligadores son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden ligar mediante métodos bien conocidos en la técnica, y como se describe en el presente documento, para formar anticuerpos biespecíficos o multidirigidos. Además, los anticuerpos biespecíficos se pueden construir mediante diversos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo al utilizar tecnología tal como Biclónica® (véase por ejemplo el documento WO 2013/157954). Un anticuerpo monoclonal biespecífico (BsMAb, BsAb) comprende normalmente dominios de unión de dos anticuerpos monoclonales diferentes y en consecuencia se une a dos epítopos diferentes. Las moléculas Biclónica®, pero también otros anticuerpos de IgG biespecíficos de longitud completa tienen dos especificidades de unión a antígeno diferentes codificadas por dos regiones variables diferentes de una molécula IgG de longitud completa de un Fab de un scFv. Los Biclónica® se pueden producir por cotransfección de células individuales con construcciones genéticas que codifican dos anticuerpos de cadena ligera común (cLC) diferentes como se detalla en otra parte del presente documento. La ingeniería de CH3 garantiza una heterodimerización eficiente y la formación de anticuerpos biespecíficos esencialmente puros.

Los anticuerpos se unen normalmente a su diana a través del denominado sitio de unión a antígeno. Un sitio de unión a antígeno no modificado está normalmente formado por y presente en el dominio variable del

anticuerpo. El dominio variable contiene dicho sitio de unión a antígeno. Un dominio variable que se une a un antígeno es un dominio variable que comprende un sitio de unión a antígeno que se une al antígeno.

El dominio variable del anticuerpo, como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto, comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL). El sitio de unión a antígeno puede estar presente en el dominio variable VH/VL combinado, o sólo en la región VH o sólo en la región VL. Cuando el sitio de unión a antígeno está presente en una de las dos regiones del dominio variable, la región variable homóloga puede contribuir al plegamiento y/o estabilidad de la región variable de unión, pero no contribuye significativamente a la unión del antígeno en sí mismo.

Como se utiliza en el presente documento, la unión a antígeno se refiere a la capacidad de unión típica de un anticuerpo a su antígeno. La unión de un anticuerpo a un antígeno se puede evaluar de varias maneras. Una forma es incubar el anticuerpo con el antígeno (preferiblemente células que expresan el antígeno), eliminar el anticuerpo no unido (preferiblemente mediante una etapa de lavado) y detectar el anticuerpo unido mediante un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo unido.

La unión a antígeno por un anticuerpo está normalmente mediada a través de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo y la estructura tridimensional específica tanto del antígeno como del dominio variable que permite que estas dos estructuras se unan con precisión (una interacción similar a la de una cerradura y una llave), a diferencia de la adhesión aleatoria, no específica de proteínas. Como un anticuerpo reconoce normalmente una parte de un antígeno denominada epítipo de un antígeno, y como dicho epítipo puede estar presente también en otros compuestos, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden reconocer también otras proteínas, si dichos otros compuestos contienen el mismo epítipo. Por lo tanto, el término "unión" no excluye la unión de los anticuerpos a otra proteína o proteínas que contiene(n) el mismo epítipo. Dicha(s) otra(s) proteína(s) no es(son) preferiblemente una proteína humana.

Un anticuerpo biespecífico de la invención normalmente no se une a otras proteínas que no sean la proteína diana especificada en la membrana de las células de un humano postnatal, preferiblemente adulto.

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento, significa una molécula proteínica, preferiblemente perteneciente a la clase de proteínas inmunoglobulina, que contiene uno o más dominios variables que se unen a un epítipo en un antígeno, donde dichos dominios se derivan o comparten homología de secuencia con el dominio variable de un anticuerpo. Los anticuerpos para uso terapéutico son preferiblemente lo más parecidos posible a los anticuerpos naturales del sujeto que se va a tratar (por ejemplo anticuerpos humanos para sujetos humanos). La unión de anticuerpos se puede expresar en términos de especificidad y afinidad. La especificidad determina qué antígeno o epítipo del mismo se une específicamente al dominio de unión. La afinidad es una medida de la fuerza de unión a un antígeno o epítipo particular. Preferiblemente, la afinidad de los brazos separados de los anticuerpos está en el rango nanomolar. Los anticuerpos tales como los biespecíficos comprenden normalmente los dominios constantes (parte Fc) de un anticuerpo natural, que se puede diseñar por ingeniería como se describe en el presente documento, por ejemplo para reducir la actividad ADCC y/o CDC. Un anticuerpo es un anticuerpo biespecífico de longitud completa, preferiblemente de la subclase IgG humana.

Los términos 'dominio variable', 'par VH/VL', 'VH/VL' se utilizan en el presente documento indistintamente. Un dominio variable se compone de la región variable de una cadena pesada y una región variable de una cadena ligera. La región variable de una cadena pesada está formada normalmente por una región VDJ reordenada. La región variable de una cadena ligera está formada normalmente por una región VJ reordenada. En la actualidad las regiones VDJ/VJ también se pueden producir artificialmente utilizando por ejemplo la gran cantidad de información disponible sobre secuencias de anticuerpos funcionales.

En algunas realizaciones, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención no tiene más de dos sitios de unión a antígeno. Esto significa que la parte de unión a antígeno de dicho anticuerpo consiste en dos sitios de unión a antígeno, sin la presencia de sitios de unión a antígeno adicionales. Cada uno de los dos sitios de unión a antígeno contiene un par de inmunoglobulinas VH/VL. Preferiblemente, la parte de unión a antígeno de un anticuerpo consiste en un dominio variable de inmunoglobulina que se puede unir a una parte extracelular de CD 137 como el miembro de la superfamilia de receptores de TNF y un dominio variable de inmunoglobulina que se puede unir a PD-L1 como la segunda proteína de membrana. Ciertas realizaciones preferidas son inmunoglobulinas que tienen un formato IgG, lo que proporciona la ventaja de que las semividas de los anticuerpos de unión bivalentes son normalmente más largas en comparación con los compuestos multivalentes. Más aún, la inmunogenicidad de las moléculas de unión bivalente normalmente es menor en comparación con la de los compuestos multivalentes. Los anticuerpos de acuerdo con estas realizaciones mantienen preferiblemente la estructura de las IgG naturales y, por lo tanto, mantienen todos los beneficios asociados a esa estructura de las IgG naturales.

Como se utiliza en el presente documento, el término "multivalente" abarca tres o más especificidades, lo que está presente, por ejemplo en las moléculas de unión trivalentes y tetravalentes.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sitio de unión a antígeno" significa un sitio de una molécula de unión o anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de un antígeno. Dicho sitio de unión a antígeno se deriva preferiblemente o comparte homología de secuencia con el dominio variable de un anticuerpo, en particular las regiones CDR del mismo. En algunas realizaciones preferidas, dicho sitio de unión a antígeno es un dominio variable de inmunoglobulina, formado por un par VH/VL de inmunoglobulina. En otras realizaciones, dicho sitio de unión a antígeno se deriva de un anticuerpo mimético, tal como por ejemplo de una molécula afficuerpo, aflina, afímero, afitina, alfacuerpo, anticalina, avímero, DARPin, finómero, péptido de dominio kunitz o monocuerpo, que se describieron en el presente documento anteriormente.

Un anticuerpo de la invención es preferiblemente un anticuerpo de "longitud completa". El término 'longitud completa' de acuerdo con la invención se define como un anticuerpo esencialmente completo, sin una o más fracciones agregadas artificialmente con un tamaño superior a 20 residuos de aminoácidos, tales como por ejemplo sitios de unión a antígeno adicionales o sitios de activación adicionales o ligandos adicionales o fracciones de unión a ligando adicionales. Sin embargo, un anticuerpo completo no tiene necesariamente todas las funciones de un anticuerpo intacto. Para evitar dudas, un anticuerpo completo contiene dos cadenas pesadas y dos ligeras. Cada cadena contiene regiones constantes (C) y variables (V), que se pueden dividir en dominios designados CH1, CH2, CH3, VH para la cadena pesada, y CL, VL para la cadena ligera. Los dominios de las cadenas pesadas están presentes preferiblemente en el orden de un anticuerpo natural (VH-CH1-CH2-CH3; lo que significa que el dominio VH es adyacente al dominio CH1, seguido por un dominio CH2 y posteriormente seguido por un dominio CH3). Los dominios de las cadenas ligeras también se presentan preferiblemente en el orden de un anticuerpo natural (VL-CL; lo que significa que el dominio VL es adyacente al dominio CL). Un anticuerpo se une al antígeno a través de los dominios variables contenidos en la porción del fragmento Fab. El anticuerpo puede interactuar con moléculas y células del sistema inmunitario a través de los dominios constantes, principalmente a través de la porción Fc. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es una IgG, preferiblemente una IgG de longitud completa. Se prefieren los anticuerpos IgG de longitud completa debido a su semivida normalmente favorable y al deseo de permanecer lo más cerca posible de moléculas totalmente autólogas (humanas) por razones de inmunogenicidad. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de IgG1 de longitud completa, un anticuerpo de IgG2 de longitud completa, un anticuerpo de IgG3 de longitud completa o un anticuerpo de IgG4 de longitud completa.

Los anticuerpos de longitud completa de acuerdo con la invención abarcan los anticuerpos en los que pueden estar presentes mutaciones que proporcionan características deseadas o son simplemente alternativas a las de la cadena original. Dichas mutaciones no deben ser supresiones de porciones sustanciales de ninguna de las regiones. Sin embargo, los anticuerpos en los que uno o varios residuos de aminoácidos son insertados, suprimidos, sustituidos o una combinación de los mismos, sin alterar esencialmente las características de unión a antígeno del anticuerpo resultante, se abarcan dentro del término "anticuerpo de longitud completa". Por ejemplo, un anticuerpo de IgG puede tener de 1-20 inserciones, sustituciones, supresiones de residuos de aminoácidos o una combinación de las mismas en la región constante.

En una realización preferida es un anticuerpo de IgG biespecífico con función efectora reducida. Un anticuerpo de la invención es preferiblemente un anticuerpo de IgG biespecífico de longitud completa, preferiblemente mutado en la región bisagra CH2/inferior para reducir la función efectora. La IgG1 que se muta en la región de bisagra CH2/inferior para reducir la función efectora se favorece por su larga semivida circulatoria en el hombre. Para evitar cualquier inmunogenicidad en humanos, se prefiere que el anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención sea un anticuerpo humano.

El término "biespecífico" (bs) significa que una parte del anticuerpo (como se definió anteriormente) se une a un epítipo de un antígeno, mientras que una segunda parte se une a un epítipo diferente del mismo antígeno o de un antígeno diferente. Los epítipos diferentes normalmente están presentes en antígenos diferentes. Sin embargo, los diferentes epítipos también pueden estar presentes en el mismo antígeno. De acuerdo con la presente invención, dicho primero y segundo antígenos son de hecho dos proteínas diferentes. Un anticuerpo biespecífico preferido es un anticuerpo que comprende partes de dos anticuerpos monoclonales diferentes y, de acuerdo con lo anterior, se puede unir a dos epítipos diferentes, preferiblemente en dos antígenos diferentes. Dependiendo del nivel de expresión, localización (sub)celular y estequiometría de los dos antígenos reconocidos por un anticuerpo biespecífico, ambos brazos Fab del anticuerpo se pueden o no unir simultáneamente a su epítipo. Un brazo del anticuerpo biespecífico contiene normalmente el dominio variable de un anticuerpo y el otro brazo contiene el dominio variable de otro anticuerpo (es decir, un brazo del anticuerpo biespecífico está formado por una cadena pesada emparejada con una cadena ligera mientras que el otro brazo está formado por una cadena pesada diferente emparejada con una cadena ligera). Las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo biespecífico de la invención son normalmente diferentes entre sí, mientras que las regiones variables de cadena ligera son las mismas en los anticuerpos biespecíficos de la invención. Un anticuerpo biespecífico en el que las diferentes regiones variables de cadena pesada están asociadas con la misma o una región variable de cadena ligera, común también se denomina como un anticuerpo biespecífico con una región variable de cadena ligera común (cLcv). Se prefiere que la región constante de la cadena ligera también sea la misma. Dichos anticuerpos biespecíficos se denominan como que tienen una cadena ligera común (cLc). Por lo tanto se proporciona además un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, en el que ambos brazos comprenden una cadena ligera común.

Los anticuerpos biespecíficos descritos en el presente documento comprenden preferiblemente un dominio variable de cadena ligera común, preferiblemente una cadena ligera común. El término “cadena ligera común” de acuerdo con la invención se refiere a cadenas ligeras que pueden ser idénticas o tener algunas diferencias de la secuencia de aminoácidos mientras que la especificidad de unión del anticuerpo de longitud completa no se ve afectada. Es posible, por ejemplo dentro del alcance de la definición de cadenas ligeras comunes como se utiliza en el presente documento, preparar o encontrar cadenas ligeras que no sean idénticas pero que sigan siendo funcionalmente equivalentes, por ejemplo, al introducir y probar cambios conservadores de aminoácidos, cambios de aminoácidos en regiones que no contribuyen o sólo contribuyen parcialmente a la especificidad de unión cuando se emparejan con la cadena pesada, y similares. Los términos ‘cadena ligera común’, ‘CL común’, ‘cLC’, ‘cadena ligera única’ con o sin la adición del término “reordenado” se utilizan en el presente documento indistintamente. Los términos ‘región variable de cadena ligera común’, ‘VL común’, ‘LCv común’, ‘cLCv’, ‘VL única’ con o sin la adición del término “reordenado” se utilizan en el presente documento indistintamente. Es un aspecto preferido de la presente invención que un anticuerpo biespecífico tenga una cadena ligera común (región variable) que se pueda combinar con al menos dos, y preferiblemente una pluralidad de cadenas pesadas (regiones variables) de diferente especificidad de unión para formar anticuerpos con dominios funcionales de unión a antígeno (documentos WO2004/009618, WO2009/157771). La cadena ligera común (región variable) es preferiblemente una cadena ligera humana (región variable). Una cadena ligera común (región variable) tiene preferiblemente una secuencia de línea germinal. Una secuencia de línea germinal preferida es una región variable de cadena ligera que se utiliza frecuentemente en el repertorio humano y tiene buena estabilidad termodinámica, rendimiento y solubilidad. Una cadena ligera de línea germinal preferida es O12. Una cadena ligera común es preferiblemente la cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVk1-39*01/IGJk1*01 (Figura 1A). La región variable de cadena ligera común de acuerdo con la invención, es la región variable de la cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVk1-39*01/IGJk1*01. Una cadena ligera común comprende la región variable de cadena ligera como se representa en la figura 1B. La cadena ligera común comprende además preferiblemente una región constante de cadena ligera, preferiblemente una región constante de cadena ligera kappa. Un ácido nucleico que codifica la cadena ligera común se puede optimizar en codones para el sistema celular utilizado para expresar la proteína de cadena ligera común. El ácido nucleico codificante se puede desviar de una secuencia de ácidos nucleicos de línea germinal.

En una realización preferida, la cadena ligera comprende una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de un segmento génico O12/IgVk1-39*01 como se representa en la figura 1A. La frase “cadena ligera O12” se utilizará a lo largo de la especificación como abreviatura de “una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de un segmento génico O12/IgVk1-39*01 como se representa en la figura 1A. IgVk1-39 es la abreviatura de Gen d Inmunoglobulina Kappa Variable 1-39. El gen también se conoce como Inmunoglobulina Kappa Variable 1-39; IGKV139; IGKV1-39; O12a o O12. Los Id externos del gen son HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Las Figuras 1B y 1D describen dos secuencias preferidas para IgVk1-39 en combinación con una región J, de las cuales la Figura 1B describe la secuencia de la invención y la Figura 1D otra secuencia IgVk1-39 en combinación con una región J. Las secuencias unidas se indican como IGKV1-39/jk1 e IGKV1-39/jk5; los nombres alternativos son IgVk1-39*01/IGJk1*01 o IgVk1-39*01/IGJk5*01 (nomenclatura de acuerdo con la base de datos mundial IMGT en imgt.org).

Se prefiere que la O12/IgVk1-39*01 que comprende la región variable de cadena ligera sea una secuencia de línea germinal. Se prefiere además que la IGJk1*01 o /IGJk5*01 que comprende la región variable de cadena ligera sea una secuencia de línea germinal. En una realización preferida, las regiones variables de cadena ligera IGKV1-39/jk1 o IGKV1-39/jk5 son secuencias de línea germinal.

En una realización preferida, la región variable de cadena ligera comprende una línea germinal O12/IgVk1-39*01. En una realización preferida, la región variable de cadena ligera comprende la cadena ligera kappa IgVk1-39*01/IGJk1*01. La región variable de cadena ligera comprende preferiblemente una cadena ligera kappa de línea germinal IgVk1-39*01/IGJk1*01.

Las células B maduras que producen un anticuerpo con una cadena ligera O12 a menudo producen una cadena ligera que se ha sometido a una o más mutaciones con respecto a la secuencia de la línea germinal, es decir, la secuencia normal en las células no linfoides del organismo. El proceso que es responsable de estas mutaciones a menudo se denomina (hiper)mutación somática. La cadena ligera resultante se denomina cadena ligera madurada por afinidad. Dichas cadenas ligeras, cuando derivan de una secuencia de línea germinal O12 son cadenas ligeras derivadas de O12. En esta especificación, la frase “cadenas ligeras O12” incluirá las cadenas ligeras derivadas de O12. Las mutaciones que se introducen por hipermutación somática también, por supuesto, e pueden introducir artificialmente en el laboratorio. En el laboratorio también se pueden introducir otras mutaciones sin afectar a las propiedades de la cadena ligera en especie, no necesariamente en cantidad. Una cadena ligera es al menos una cadena ligera O12 si comprende una secuencia como la representada en la figura 1A, figura 1B; figura 1D o figura 1E con 0-10, preferiblemente 0-5 inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones de aminoácidos o una combinación de las mismas. En una realización preferida la cadena ligera O12 es una cadena ligera que comprende una secuencia como se representa en la figura 1A; 1B; 1D o 1E con 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4 inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones de aminoácidos o

una combinación de las mismas. En una realización preferida la cadena ligera 012 es una cadena ligera que comprende una secuencia como se representa en la figura 1A, figura 1B; figura 1D o figura 1E con 0-5, preferiblemente 0-4, más preferiblemente 0-3 inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones de aminoácidos o una combinación de las mismas. En una realización preferida la cadena ligera 012 es una cadena ligera que comprende una secuencia como se representa en la figura 1A, figura 1B; figura 1D o figura 1E con 0-2, más preferiblemente 0-1, lo más preferiblemente 0 inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones de aminoácidos o una combinación de las mismas. En una realización preferida la cadena ligera 012 es una cadena ligera que comprende una secuencia como se representa en la figura 1A con las inserciones, supresiones, sustituciones, adiciones de aminoácidos mencionadas o una combinación de las mismas. En una realización preferida la cadena ligera comprende la secuencia de la figura 1A. La región variable de cadena ligera de la invención comprende la secuencia de la figura 1B.

La cadena ligera común (región variable) puede ser una cadena ligera lambda y, por lo tanto, también se proporciona en el contexto de la invención, sin embargo, se prefiere una cadena ligera kappa. La parte constante de una cadena ligera común de la invención puede ser una región constante de una cadena ligera kappa o lambda. Es preferiblemente una región constante de una cadena ligera kappa, preferiblemente en la que dicha cadena ligera común es una cadena ligera de línea germinal, preferiblemente una cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada que comprende el segmento génico IgVKI-39, más preferiblemente la cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVKI-39*01/IGJKI*01 (Figura 1). Los términos cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVk1-39*01/IGJK1*01, IGKV1-39/IGKJ1, cadena ligera huVk1-39 o, abreviado, huVk1-39, o simplemente 1-39 se utilizan indistintamente a lo largo de la solicitud. Obviamente, los expertos en la técnica reconocerán que "común" también se refiere a equivalentes funcionales de la cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos no es idéntica. Existen muchas variantes de dicha cadena ligera en las que están presentes mutaciones (supresiones, sustituciones, adiciones) que no influyen en la formación de regiones de unión funcionales.

IgVk1-39 es la abreviatura de Gen de Inmunoglobulina Kappa Variable 1-39. El gen también se conoce como Inmunoglobulina Kappa Variable 1-39; IGKV139; IGKV1-39; O12a o 012. Los Id externos del gen son HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. En la figura 1 se proporciona la secuencia de aminoácidos preferida para la IgVk1-39. Se enumera la secuencia de la región V. La región V se puede combinar con una de las cinco regiones J. En la Figura 1 se describen dos secuencias preferidas para la IgVk1-39 en combinación con una región J. Las secuencias unidas se indican como IGKV1-39/jk1 e IGKV1-39/jk5; los nombres alternativos son IgVk1-39*01/IGJK1*01 o IgVk1-39*01/IGJK5*01 (nomenclatura de acuerdo con la base de datos mundial IMGT en imgt.org).

Una región variable de cadena ligera común está preferiblemente ligada a una región constante de cadena ligera kappa.

Una célula que produce una cadena ligera común puede producir, por ejemplo una cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgVk1-39*01/IGJK1*01 y una cadena ligera que comprende la región variable de la cadena ligera mencionada fusionada a una región constante lambda.

Los anticuerpos biespecíficos de acuerdo con la invención tienen una combinación de región variable de cadena pesada/región variable de cadena ligera (VH/VL) que se une a una parte extracelular de CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF y una segunda combinación VH/VL que se une a una parte extracelular de PD-L1 como miembro de la familia B7. Como se describe en el presente documento, esto proporciona la ventaja de que se puede promover particularmente bien una respuesta inmunitaria deseada, ya que los miembros de la familia B7 suministran señales 'coestimuladoras' o 'coinhibidoras' a los linfocitos, aumentando o atenuando de esta manera una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, al dirigir un miembro de la familia B7 es posible mejorar las señales estimuladoras y/o contrarrestar las señales inhibitoras, induciendo o mejorando de esta manera una respuesta inmunitaria deseada, por ejemplo contra células aberrantes.

De acuerdo con la invención, las VL en la primera y segunda combinaciones VH/VL son idénticas. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa que tiene una combinación de cadena pesada/ligera (H/L) que se une a una parte extracelular de un miembro de la superfamilia del receptor TNF y una combinación de cadena H/L que se une a una parte extracelular de un miembro de la familia B7. En una realización preferida, la cadena ligera de dicha primera combinación de cadenas H/L es similar a la cadena ligera de dicha segunda combinación de cadenas H/L. En una realización más preferida, las cadenas ligeras en la primera y segunda combinaciones de cadenas H/L son idénticas.

Se han publicado varios métodos para favorecer la producción del anticuerpo biespecífico o viceversa, los anticuerpos monoespecíficos. En la presente invención se prefiere que la célula favorezca la producción del anticuerpo biespecífico frente a la producción de los respectivos anticuerpos monoespecíficos. Esto se consigue normalmente al modificar la región constante de las cadenas pesadas de tal manera que favorezcan la heterodimerización (es decir, la dimerización con la cadena pesada de la otra combinación de cadena pesada/ligera) en lugar de la homodimerización. En una realización preferida, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende dos cadenas pesadas de inmunoglobulina diferentes con dominios de heterodimerización

compatibles. En la técnica se han descrito varios dominios de heterodimerización compatibles. Los dominios de heterodimerización compatibles son preferiblemente dominios de heterodimerización CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina compatibles. Cuando se utilizan dominios CH3 de tipo silvestre, la coexpresión de dos cadenas pesadas diferentes (A y B) y una cadena ligera común dará lugar a tres especies de anticuerpos diferentes, AA, AB y BB. AA y BB son designaciones para los dos anticuerpos monoespecíficos bivalentes, y AB es una designación para el anticuerpo biespecífico. Para aumentar el porcentaje del producto biespecífico deseado (AB) se puede emplear ingeniería de CH3, o en otras palabras, se pueden utilizar cadenas pesadas con dominios de heterodimerización compatibles, como se define a continuación. La técnica describe varias maneras en las que se puede lograr dicha heterodimerización de cadenas pesadas. Una forma es generar anticuerpos biespecíficos de "perilla en agujero". Véase Solicitud de Patente Estadounidense 20030078385 (Arathoon et al.).

El término 'dominios de heterodimerización compatibles', como se utiliza en el presente documento, se refiere a los dominios proteicos que están diseñados de tal manera que el dominio diseñado A' formará preferencialmente heterodímeros con el dominio diseñado B' y viceversa, disminuyendo la homodimerización entre A'-A' y B'-B'.

En los documentos US13/866,747 (publicado ahora como US 9,248,181), US14/081,848 (publicado ahora como US 9,358,286) y PCT/NL2013/050294 (publicado como WO2013/157954) se divulgan métodos y medios para producir anticuerpos biespecíficos utilizando dominios de heterodimerización compatibles. Estos medios y métodos también se pueden emplear favorablemente en la presente invención. Específicamente, un anticuerpo biespecífico de la invención comprende preferiblemente mutaciones para producir esencialmente sólo moléculas IgG biespecíficas de longitud completa. Las mutaciones preferidas son las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración EU) en el primer dominio CH3 (la cadena pesada 'variante KK') y las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E en el segundo dominio (la cadena pesada 'variante DE'), o viceversa. En nuestras patentes US 9,248,181 y US 9,358,286 así como en la solicitud WO2013/157954 PCT se demostró previamente que la variante DE y la variante KK se emparejan preferencialmente para formar heterodímeros (las llamadas moléculas biespecíficas "DEKK"). La homodimerización de cadenas pesadas de variantes DE (homodímeros DEDE) apenas se produce debido a la repulsión entre los residuos cargados en la interfaz CH3-CH3 entre cadenas pesadas idénticas.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden generar por transfección (transitoria) de un plásmido o plásmidos que codifican una cadena ligera y dos cadenas pesadas diferentes que están modificadas por ingeniería de CH3 para asegurar la heterodimerización eficiente y la formación de los anticuerpos biespecíficos. La producción de estas cadenas en una sola célula favorece la formación de anticuerpos biespecíficos frente a la formación de anticuerpos monoespecíficos. Las mutaciones preferidas para producir esencialmente sólo moléculas de IgG1 biespecíficas de longitud completa son las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 351 y 366, por ejemplo L351K y T366K (numeración de acuerdo con la numeración EU) en el primer dominio CH3 (la cadena pesada 'variante KK') y las sustituciones de aminoácidos en las posiciones 351 y 368, por ejemplo L351D y L368E en el segundo dominio CH3 (la cadena pesada "variante DE"), o viceversa.

En una realización, la combinación de cadena pesada/cadena ligera que comprende el dominio variable que se une a CD137, comprende una variante DE de la cadena pesada. En esta realización, la combinación de cadena pesada/cadena ligera que comprende el dominio variable que se puede unir a un antígeno distinto de CD137 comprende una variante KK de la cadena pesada. Se reconocerá que una de la invención también puede comprender un dominio variable que se une a CD137, y comprende una variante KK de la cadena pesada, así como otras variaciones conocidas por los expertos en la materia utilizadas para facilitar la heterodimerización con un dominio variable que se puede unir a un antígeno distinto de CD137.

La región Fc media las funciones efectoras de un anticuerpo, tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP). Dependiendo de la aplicación del anticuerpo terapéutico o de la proteína de fusión Fc, puede ser deseable reducir o aumentar la función efectora. En la presente divulgación se prefieren funciones efectoras reducidas. Una función efectora reducida puede ser deseable cuando se desea activar, mejorar o estimular una respuesta inmunitaria como en algunos de los aspectos de la divulgación. Los anticuerpos con funciones efectoras reducidas se pueden utilizar para dirigirse a moléculas de superficie celular de células inmunitarias, entre otras.

Se descubrió que la unión de IgG a los FcγRs o C1q requería residuos localizados en la región bisagra y el dominio CH2. Dos regiones del dominio CH2 (Figura 2D) son relevantes para la unión a FcγRs y C1q. Se demostró que las sustituciones en la IgG1 humana de los residuos IgG2 en las posiciones 233-236 y de los residuos IgG4 en las posiciones 327, 330 y 331 reducen en gran medida la ADCC y la CDC (Armour et al., 1999. Eur J Immunol. 29(8):2613-24; Shields et al., 2001. J Biol Chem. 276(9):6591-604). Además, Idusogie et al. demostraron que la sustitución de alanina en diferentes posiciones, que incluye K322 reducía significativamente la activación del complemento (Idusogie et al., 2000. J Immunol. 164(8):4178-84).

Debido a sus funciones efectoras reducidas, los anticuerpos IgG4 representan una subclase IgG para el bloqueo de receptores sin agotamiento celular. Las moléculas IgG4 pueden intercambiar semimoléculas en un proceso dinámico denominado intercambio de brazo Fab. Este fenómeno se puede producir entre anticuerpos terapéuticos e IgG4 endógenos. La mutación S228P es un ejemplo de mutación que garantiza una capacidad reducida de intercambio Fab-brazo. (Labrijn. et al., 2009. Nat Biotechnol. 27(8):767-71.

Los anticuerpos con funciones efectoras reducidas son preferiblemente anticuerpos IgG que comprenden una región bisagra inferior/CH2 modificada, por ejemplo para reducir la interacción Fc-receptor o para reducir la unión C1q. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de IgG con una CH2 mutante y/o un dominio de bisagra inferior de tal manera que se reduce la interacción del anticuerpo de IgG biespecífico con un receptor Fc-gamma. Un anticuerpo que comprende una región CH2 mutante es preferiblemente un anticuerpo de IgG1. Dicho CH2 IgG1 mutante y/o dominio de bisagra inferior comprende preferiblemente una sustitución amino en la posición 235 y/o 236 (numeración EU), preferiblemente una sustitución L235G y/o G236R (Figura 2E).

La especificidad de unión se define por la capacidad de unir una parte extracelular de una primera proteína de membrana y una segunda proteína de membrana como se describe en el presente documento.

Un anticuerpo biespecífico de la presente invención se utiliza preferiblemente en humanos. Para ello, el anticuerpo biespecífico es preferiblemente un anticuerpo humano o humanizado. La tolerancia de un humano a un polipéptido se rige por muchos aspectos diferentes. La inmunidad, ya sea mediada por células T, por células B u otras, es una de las variables que se abarcan en la tolerancia del ser humano a un polipéptido. La región constante de un anticuerpo biespecífico de la presente invención comprende preferiblemente una región constante de cadena pesada humana, que comprende preferiblemente una secuencia como la representada en la figura 2; y una región constante de cadena ligera humana, que comprende preferiblemente una secuencia como la representada en la figura 1C. La región constante puede contener una o más, preferiblemente no más de 10, preferiblemente no más de 5 diferencias de aminoácidos con la región constante de un anticuerpo humano de origen natural. Se prefiere que la parte constante se derive en su totalidad de un anticuerpo humano de origen natural. Varios anticuerpos producidos en el presente documento se derivan de ratones de cadena ligera común inmunizados con la diana respectiva como se describe en el documento WO2009/157771. Varios anticuerpos producidos en el presente documento se derivan de una biblioteca de dominios variables de anticuerpos humanos. Como tales, estos dominios variables son humanos. Las regiones CDR únicas se pueden derivar de humanos, ser sintéticas o derivar de otro organismo. La región variable es al menos una región variable humana cuando tiene, con la excepción de las regiones CDR, una secuencia de aminoácidos que es idéntica a una secuencia de aminoácidos de la región variable de un anticuerpo humano de origen natural. En dichas realizaciones, la VH de un dominio variable de un anticuerpo que se une a un miembro de la superfamilia del receptor del TNF o a un miembro asociado a la membrana de la familia B7, o a una cadena ligera en un anticuerpo de la invención, puede contener una o más, preferiblemente no más de 10, preferiblemente no más de 5 diferencias de aminoácidos con la región variable de un anticuerpo humano de origen natural, sin contar las posibles diferencias en la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR. Dichas mutaciones también se producen en la naturaleza en el contexto de la hipermutación somática.

Los anticuerpos se pueden derivar de varias especies animales, al menos con respecto a la región variable de cadena pesada. Es práctica común humanizar dichas regiones variables de cadena pesada por ejemplo murinas. Hay varias maneras de conseguirlo, entre las que se encuentran el injerto de CDR en una región variable de cadena pesada humana con una estructura 3D que coincida con la estructura 3D de la región variable de cadena pesada murina; la desinmunización de la región variable de cadena pesada murina, preferiblemente se realiza al eliminar epítomos de células T o B conocidos o sospechosos de la región variable de cadena pesada murina. La eliminación se realiza normalmente al sustituir uno o más de los aminoácidos del epítomo por otro aminoácido (normalmente conservador), de tal manera que la secuencia del epítomo se modifica de manera que ya no es un epítomo de células B o T.

Las regiones variables de cadena pesada murina desinmunizadas son menos inmunogénicas en humanos que la región variable de cadena pesada murina original. Preferiblemente, una región variable o dominio de la invención se humaniza aún más, como por ejemplo recubrimiento. Al utilizar técnicas de recubrimiento, los residuos exteriores que son fácilmente encontrados por el sistema inmunitario se reemplazan selectivamente por residuos humanos para proporcionar una molécula híbrida que comprende una superficie recubierta débilmente inmunógena o sustancialmente no inmunógena. Un animal como se utiliza en la invención es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate, y más preferiblemente un humano.

Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención comprende preferiblemente una región constante de un anticuerpo humano. De acuerdo con las diferencias en sus dominios constantes de cadena pesada, los anticuerpos se agrupan en cinco clases, o isotipos: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estas clases o isotipos comprenden al menos una de dichas cadenas pesadas que se denomina con la letra griega correspondiente. En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo en el que dicha región constante se selecciona del grupo de regiones constantes IgG, es decir se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Preferiblemente, dicha región constante es una región constante IgG4 o IgG1 (Figura 2), más

preferiblemente una región constante IgG1 mutada. Cierta variación en la región constante de IgG1 ocurre en la naturaleza y/o está permitida sin cambiar las propiedades inmunológicas del anticuerpo resultante. Normalmente, se permiten entre 1-10 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas en la región constante. La región constante se puede mutar como se indica en el presente documento para permitir una heterodimerización eficaz, para reducir la función efectora o por otras razones que incluye la semivida, la estabilidad y similares.

Los métodos racionales han evolucionado hacia la minimización del contenido de residuos no humanos en el contexto humano. Están disponibles varios métodos para injertar con éxito la propiedad de unión a antígeno de un anticuerpo en otro anticuerpo. Las propiedades de unión de los anticuerpos pueden descansar predominantemente en la secuencia exacta de la región CDR3, a menudo apoyada por la secuencia de las regiones CDR1 y CDR2 en el dominio variable combinada con la estructura apropiada del dominio variable en su conjunto. Actualmente se dispone de varios métodos para injertar regiones CDR en un dominio variable adecuado de otro anticuerpo. Algunos de estos métodos se revisan en J.C. Almagro¹ y J. Fransson (2008) *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633, que se incluye por referencia en el presente documento.

La región variable de cadena ligera de un dominio variable que comprende una secuencia variable de cadena pesada como se representa en la Figura 3, es preferiblemente una cadena ligera de línea germinal de o basada en 012, preferiblemente la cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgV1-39*01/IGJk1*01 o un fragmento o un derivado funcional de la misma (nomenclatura de acuerdo con la base de datos IMGT mundial en la web imgt.org). Se utilizan los términos cadena ligera kappa humana de línea germinal reordenada IgV1-39*01/IGJk1*01, IGKV1-39/IGKJ1, cadena ligera huV1-39 o, abreviado, huV1-39. La cadena ligera puede tener 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas. Las mencionadas 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos son preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservadoras, las inserciones, supresiones, sustituciones o combinación de las mismas no se encuentran en la región CDR1, CDR2 o CDR3 o en la región FR4 de la cadena VL. En la figura 1 se representa una secuencia preferida para la cadena ligera común.

Están disponibles varios métodos para producir anticuerpos biespecíficos. Un método implica la expresión de dos cadenas pesadas diferentes y dos cadenas ligeras diferentes en una célula y la recolección del anticuerpo producido por la célula. El anticuerpo producido de esta manera contendrá normalmente una colección de anticuerpos con diferentes combinaciones de cadenas pesadas y ligeras, algunas de las cuales son el anticuerpo biespecífico deseado. El anticuerpo biespecífico se puede purificar posteriormente a partir de la colección. La relación de anticuerpos biespecíficos con respecto a otros anticuerpos producidos por la célula se puede aumentar de varias maneras. En una realización preferida de la invención, la relación se aumenta al expresar en la célula no dos cadenas ligeras diferentes, sino dos cadenas ligeras esencialmente idénticas. Las dos cadenas ligeras esencialmente idénticas pueden ser cadenas ligeras con esencialmente las mismas regiones variables de cadena ligera y diferentes regiones constantes de cadena ligera o, preferiblemente, dos regiones constantes de cadena ligera esencialmente idénticas. Este concepto también se conoce en la técnica como método de "cadena ligera común". Cuando las cadenas ligeras esencialmente idénticas trabajan conjuntamente con las dos cadenas pesadas diferentes permitiendo la formación de dominios variables con diferentes sitios de unión a antígeno y concomitantemente diferentes propiedades de unión, la relación de anticuerpo biespecífico con respecto a otro anticuerpo que es producido por la célula mejora significativamente con respecto a la expresión de dos cadenas ligeras esencialmente diferentes. La relación de anticuerpos biespecíficos producidos por la célula se puede mejorar aún más al estimular el emparejamiento de dos cadenas pesadas diferentes entre sí sobre el emparejamiento de dos cadenas pesadas idénticas. La técnica describe varias maneras en las que se puede lograr dicha heterodimerización de cadenas pesadas. Un método preferido se describe en la solicitud provisional estadounidense 61/635.935, que ha sido seguida por la solicitud regular estadounidense No. 13/866,747 (ahora publicada como Patente estadounidense No. 9,248,181) y la solicitud PCT No. PCT/NL2013/050294 (WO 2013/157954 A1). Se divulgan métodos y medios para producir anticuerpos biespecíficos (a partir de una única célula), en los que se proporcionan medios que favorecen la formación de anticuerpos biespecíficos sobre la formación de anticuerpos mono-específicos. Estos métodos también se pueden emplear favorablemente en la presente invención.

La divulgación también describe un método para producir un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención a partir de una única célula, en el que dicho anticuerpo biespecífico comprende dos dominios CH3 que son capaces de formar una interfaz, dicho método comprende proporcionar:

- una célula que tiene a) una primera molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende un sitio de unión a antígeno que se puede unir a una parte extracelular de CD137 y que contiene un 1er dominio CH3, y b) una segunda molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada que comprende un sitio de unión a antígeno que se puede unir a una parte extracelular de PD-L1 y que contiene un 2º dominio CH3, en el que dichas moléculas de ácido nucleico se proporcionan con medios para el emparejamiento preferencial de dichos 1er y 2do dominios CH3,

dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de las proteínas codificadas por dichas dos moléculas de ácido nucleico y cosechar dicho anticuerpo de IgG biespecífico del

cultivo. En una realización particularmente preferida, dicha célula también tiene una tercera molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común. Dicha primera, segunda y tercera molécula de ácido nucleico pueden ser parte de la misma molécula de ácido nucleico, vector o vehículo de suministro de genes y se pueden integrar en el mismo sitio del genoma de la célula huésped. Alternativamente, dichas primera, segunda y tercera moléculas de ácido nucleico se proporcionan por separado a dicha célula. Una cadena ligera común preferida se basa en 012, preferiblemente es la cadena ligera kappa humana reordenada de la línea germinal IgVκ1 39*01/IGJκ1*01, como se describió anteriormente. Los medios para el emparejamiento preferencial de dicho 1er y dicho 2do dominio CH3 son preferiblemente las mutaciones correspondientes en el dominio CH3 de las regiones codificantes de la cadena pesada. Las mutaciones preferidas para producir esencialmente sólo anticuerpos biespecíficos son las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración de acuerdo con la numeración EU) en el primer dominio CH3 y las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E en el segundo dominio CH3, o viceversa (Figura 2). Por lo tanto, se proporciona además un método de acuerdo con la invención para producir un anticuerpo biespecífico, en el que dicho primer dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K (numeración de acuerdo con la numeración EU) y en el que dicho segundo dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de proteínas codificadas por dichas moléculas de ácido nucleico y cosechar dicho anticuerpo biespecífico del cultivo. También se describen métodos para producir un anticuerpo biespecífico, en el que dicho primer dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351D y L368E (numeración de acuerdo con la numeración EU) y en el que dicho segundo dominio CH3 comprende las sustituciones de aminoácidos L351K y T366K, dicho método comprende además la etapa de cultivar dicha célula y permitir la expresión de dichas moléculas de ácido nucleico y cosechar dicho anticuerpo biespecífico del cultivo. Los anticuerpos que se pueden producir mediante estos métodos también forman parte de la presente divulgación. Los dominios de heterodimerización CH3 son preferiblemente dominios de heterodimerización IgG1. Las regiones constantes de cadena pesada que comprenden los dominios de heterodimerización CH3 son preferiblemente regiones constantes IgG1.

El miembro de la superfamilia de receptores de TNF (primera proteína de membrana) es CD137. Un anticuerpo biespecífico de la invención comprende preferiblemente un sitio de unión (antígeno) para dicha primera proteína de membrana. En algunas realizaciones, un anticuerpo biespecífico de la invención es monovalente para dicha primera proteína de membrana. Un anticuerpo biespecífico comprende un sitio de unión (antígeno) para dicha segunda proteína de membrana. En algunas realizaciones un anticuerpo biespecífico de la invención es monovalente para dicha segunda proteína de membrana. En algunas realizaciones un anticuerpo biespecífico de la invención es monovalente para dicha primera proteína de membrana y monovalente para dicha segunda proteína de membrana. En algunas realizaciones un anticuerpo biespecífico de la invención es monovalente para CD137 y monovalente para PD-L1. Se sabe en la técnica que los anticuerpos monoclonales bivalentes anti CD137 activan CD137 mientras que los anticuerpos biespecíficos monovalentes CD137 de la técnica anterior normalmente no activan.

La primera proteína de membrana según se reivindica en el presente documento, CD 137, es un miembro de la superfamilia de receptores TNF que son proteínas de membrana celular. Se dice que una proteína es una proteína de membrana en una célula si tiene una región transmembrana que está presente en la membrana celular de la célula en la que se encuentra. Esta es la primera célula como se describe en el presente documento. CD137 como primera proteína de membrana es una proteína de membrana celular que tiene una parte extracelular cuando está presente en la membrana celular. La membrana celular es la membrana de una célula que separa el interior de la célula del exterior de la célula. La primera proteína de membrana está en la membrana celular de la primera célula como se describe en el presente documento. En el contexto de un anticuerpo biespecífico de la invención o de un método o uso de la invención, la primera proteína de membrana está en la membrana celular de la primera célula como se describe en el presente documento. La primera proteína de membrana puede estar presente en dicha segunda célula, pero se prefiere que la expresión de la primera proteína de membrana sea insignificante en dicha segunda célula. Normalmente, el nivel de dicha primera proteína de membrana en dicha segunda célula es como máximo del 10 % en comparación con la expresión de la primera proteína de membrana en la primera célula. Preferiblemente la segunda célula no expresa significativamente dicha primera proteína de membrana. La expresión es al menos no significativa si la primera proteína de membrana no se puede detectar (por encima del fondo) mediante fluorescencia inmunitaria en un ensayo FACS con un anticuerpo específico para dicha primera proteína de membrana.

La segunda proteína de membrana, PD-L1, es igualmente una proteína de membrana celular. Tiene una región transmembrana que está presente en la membrana celular de la célula en la que se encuentra. Esta es la segunda célula descrita en el presente documento. La segunda proteína de membrana es una proteína de membrana celular que tiene una parte extracelular cuando está presente en la membrana celular. En el contexto de un anticuerpo biespecífico de la invención o de un método o uso de la invención, la segunda proteína de membrana está en la membrana celular de la segunda célula, como se describe en el presente documento. La segunda proteína de membrana puede estar presente en dicha primera célula, pero se prefiere que la expresión de la segunda proteína de membrana sea insignificante en dicha primera célula. Normalmente, el nivel de dicha segunda proteína de membrana en dicha primera célula es como máximo del 10 % en comparación con la expresión de la segunda proteína de membrana en la segunda célula. Preferiblemente la primera célula no

expresa significativamente dicha segunda proteína de membrana. La expresión es al menos no significativa si la segunda proteína de membrana no se puede detectar (por encima del fondo) por medio de fluorescencia inmunitaria en un ensayo FACS con un anticuerpo específico para dicha segunda proteína de membrana.

Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención tiene un sitio de unión a antígeno que se puede unir a una parte extracelular de CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF, y un segundo sitio de unión a antígeno que se puede unir a PD-L1 como segunda proteína de membrana. Esto proporciona la ventaja de que se evita al menos en parte, la activación *in cis* de células (inmunitarias) como las células T que expresan varios miembros diferentes de la superfamilia de receptores de TNF, reduciendo de esta manera los posibles efectos secundarios adversos y la toxicidad debidos a la activación inespecífica de células T. Estas realizaciones de la presente invención contrastan con los enfoques del estado de la técnica que se relacionan con agentes de unión que se unen a receptores de la superfamilia de TNF, en particular agentes de unión que se unen a al menos dos receptores diferentes de la superfamilia de TNF. Dichos enfoques del estado de la técnica pueden conducir a la activación de células T *in cis*, lo que significa en ausencia de una segunda diana, y pueden implicar el riesgo de una respuesta excesiva de células T, por ejemplo dando lugar a una tormenta de citocinas. En consecuencia, dichos enfoques del estado de la técnica tienen un mayor potencial de efectos secundarios adversos en comparación con un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que tiene un primer sitio de unión a antígeno que se puede unir a una parte extracelular de CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF y PD-L1 como segundo sitio de unión a antígeno PD-L1.

Se proporciona así un anticuerpo biespecífico como se define en las reivindicaciones adjuntas que comprende un sitio de unión a antígeno que se puede unir a una parte extracelular de CD137 y un sitio de unión a antígeno que se puede unir a una parte extracelular de una segunda proteína de membrana, en el que dicha segunda proteína de membrana es PD-L1. Como se define en las reivindicaciones adjuntas, también se proporciona un método para estimular la actividad de CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF en una célula que comprende proporcionar una primera célula y una segunda célula, en la que dicha primera célula tiene dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF en la membrana celular y dicha segunda célula tiene PD-L1 como segunda proteína de membrana en la membrana celular, el método comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo biespecífico que comprende dos dominios variables, en el que un dominio variable comprende un primer sitio de unión a antígeno que se puede unir a una parte extracelular de CD137 como dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF y otro dominio variable comprende un segundo sitio de unión a antígeno que se puede unir a una parte extracelular de PD-L1 como dicha proteína de segunda membrana, estimulando de esta manera la actividad de dicho miembro en dicha primera célula. En algunas realizaciones, dicho método es un método *in vitro*.

Como se define en las reivindicaciones adjuntas, dicho anticuerpo biespecífico comprende un sitio de unión a antígeno que se puede unir a CD137 como dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF y un sitio de unión a antígeno que se puede unir a dicha segunda proteína de membrana que es PD-L1. En algunas realizaciones preferidas de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas, la parte de unión a antígeno de dicho anticuerpo biespecífico consiste en un dominio variable de inmunoglobulina que se puede unir a una parte extracelular de CD137 como dicho miembro de la superfamilia del receptor de TNF y un dominio variable de inmunoglobulina que se puede unir a dicha segunda proteína de membrana que es PD-L1. Dicho anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo biespecífico es una IgG de longitud completa, es decir, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, preferiblemente una IgG1 de longitud completa o una IgG4 de longitud completa.

Un dominio variable que "bloquea" la unión de CD137 como dicha primera proteína de membrana a un socio de unión de la misma interfiere con la unión de la primera proteína de membrana a dicho socio de unión. Dicho dominio variable se puede unir a dicha primera proteína de membrana. Dicho dominio variable de bloqueo se puede unir a un epítipo en dicha primera proteína de membrana y competir con un socio de unión de la primera proteína de membrana para unirse al epítipo. Dicho dominio variable de bloqueo y el socio de unión de la primera proteína de membrana también se pueden unir a diferentes epítipos de dicha primera proteína de membrana. En tales casos, la actividad de bloqueo se puede deber por ejemplo a una disminución de la unión del socio de unión, y/o al desplazamiento del socio de unión cuando ya está unido a dicha primera proteína de membrana, y/o un dominio variable de bloqueo puede impedir la unión de un socio de unión a la primera proteína de membrana mediante impedimento estérico. Todos estos y otros mecanismos pueden, al menos parcialmente, impedir que dicho socio de unión se una a dicha primera proteína de membrana.

En una realización, el dominio que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF bloquea la unión del miembro a un ligando del miembro. Las interacciones ligando-miembro de la superfamilia de receptores de TNF se han estudiado ampliamente en la técnica. En general, se sabe que los miembros de la superfamilia de receptores del TNF tienen al menos un ligando. Ejemplos de pares de ligandos de receptores conocidos son los receptores TNF del receptor 1 y 2 del factor de necrosis tumoral y el ligando TNF-alfa; el receptor OX40 y el ligando OX40L; el receptor CD40 y el ligando CD154; el receptor Fas y el ligando FasL; el receptor CD30 y el ligando CD153; y el receptor CD137 y el ligando CD137L. En algunas realizaciones, el dominio variable que comprende un sitio de unión a antígeno

que se une al miembro de la superfamilia del receptor del TNF no bloquea la unión del miembro a un ligando del miembro.

En algunas realizaciones, el dominio comprende un sitio de unión a antígeno que se une a CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF y bloquea la unión de su proteína de membrana diana de la superfamilia de receptores de TNF a un socio de unión de la misma. Dicho dominio variable se caracteriza además porque cuando se proporciona en un anticuerpo bivalente mono-específico que comprende dos de dichos dominios variables, no estimula la actividad del miembro de la superfamilia de receptores de TNF en una célula sin entrecruzamiento. En una realización en la que el dominio que comprende un sitio de unión a antígeno que se une a CD137 como miembro de la superfamilia del receptor de TNF comprende un dominio variable que bloquea la unión de CD137 a CD137L, dicho dominio variable se caracteriza además porque, cuando se proporciona en un anticuerpo bivalente mono-específico que comprende dos de dichos dominios variables, no estimula la actividad de CD137 en una célula.

Los términos “socios de unión; par de unión; par de ligando receptor y similares se refieren a proteínas que se pueden unir entre sí y ejercer una actividad como resultado de la unión. Al menos uno de los socios o pares es una proteína de membrana en la membrana celular de una célula. La actividad se ejerce normalmente en la célula que tiene esta proteína de membrana en la célula.

Un dominio variable que bloquea la unión de un par de unión específico de proteínas de membrana como se describe en el presente documento, reduce normalmente la unión del par en comparación con la unión en ausencia del dominio variable. Esto se mide preferiblemente en un ensayo *in vitro*. Normalmente, esto se hace al incubar el dominio variable con la proteína de membrana a la que se puede unir y posteriormente incubar la mezcla con el otro miembro del par. La unión del par se compara entonces con la unión del par en ausencia del dominio variable. Un dominio variable puede impedir completamente la unión de la primera proteína de membrana a un socio de unión de la misma. También puede impedir parcialmente la unión del par de unión. Un dominio variable que bloquea la unión de un par de unión específico de proteínas de membrana reduce preferiblemente la unión del par en al menos un 50 %, preferiblemente en al menos un 60 %, preferiblemente en al menos un 70 %, preferiblemente en al menos un 80 %, y más preferiblemente en al menos un 90 % en comparación con la unión en ausencia del dominio variable. El bloqueo de la unión por un dominio variable se define en el presente documento como el bloqueo obtenido utilizando un anticuerpo monoclonal bivalente que comprende dos de dichos dominios variables. Por supuesto el dominio variable también bloquea la unión cuando está presente en un anticuerpo que comprende dicho dominio variable y un dominio variable que se une a una segunda proteína de membrana.

Los dominios variables específicos que se pueden unir a una parte extracelular de CD137 y que bloquean al menos parcialmente la unión del ligando de CD137 a CD137 son dominios variables que comprenden la secuencia de aminoácidos del VH de: MF6754; MF6763; MF6785; o MF6797.

Los dominios variables específicos que se pueden unir a una parte extracelular de PD-L1 y que bloquean la unión de PD1 a PD-L1 son dominios variables que comprenden la secuencia de aminoácidos de VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5359; MF5377; MF5382; MF5424; MF5426; MF5439; MF5442; MF5553; MF5557; MF5561; MF5576; MF5594; o MF5708. Las secuencias de aminoácidos se representan en la figura 3.

La actividad estimulante de un miembro de la superfamilia de receptores del TNF en una célula se mide normalmente al medir una actividad biológica de la célula. El tipo de actividad depende de qué miembro de la superfamilia de receptores de TNF se analiza. Para CD137, por ejemplo, se puede medir el estado de activación de una célula T positiva a CD137. CD137 es la denominada proteína coestimuladora que estimula la activación de una célula T activada. En la sección de ejemplos se proporcionan métodos adecuados para medir la activación de una célula T. Un método consiste en medir la producción de IL-2, IFN γ y/o TNF α por parte de una célula T activada o una composición que comprenda dicha célula T. Otros receptores de TNF tienen diferentes actividades biológicas. La actividad de un miembro de la superfamilia de receptores de TNF se estimula cuando la actividad medida en presencia de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención, es mayor que la actividad medida bajo condiciones por lo demás idénticas en ausencia del anticuerpo biespecífico, de acuerdo con la invención. La estimulación de la actividad incluye la inducción de una actividad y la mejora de una actividad ya presente.

La actividad estimulante de CD137 se mide preferiblemente al medir una actividad biológica de la célula que comprende CD137. La actividad biológica es preferiblemente el estado de activación de la célula que expresa CD137. CD137 es una molécula coestimuladora expresada en células inmunitarias, que incluyen las células T activadas. La estimulación de la actividad de CD137 se mide preferiblemente al determinar el nivel de activación de las células inmunitarias, por ejemplo de las células T activadas. En un individuo, la estimulación de la actividad de CD137 se mide preferiblemente al medir la activación de las células inmunitarias y/o células T del individuo. Alternativamente, también se puede determinar, en su caso, al medir la respuesta tumoral en el individuo; la carga vírica del individuo; o la carga parasitaria del individuo.

La divulgación también proporciona un método de acoplamiento y/o activación de células T que comprende proporcionar un sistema que comprende una célula T y una célula (segunda célula) a la que dicha célula T se va a acoplar o activar, y proporcionar dicho sistema con al menos un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable que se puede unir a CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF y un dominio variable que se puede unir a una parte extracelular de PD-L1 como segunda proteína, e incubar dicho sistema en condiciones permisivas para que la célula T se acople y/o active. En algunos aspectos, dicho método es un método *in vitro*. Dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF es CD137, y dicha segunda proteína de membrana es PD-L1. La célula a la que dicha célula T se va a acoplar o activar es preferiblemente una célula inmunitaria (por ejemplo una célula presentadora de antígeno, o un macrófago), una célula neoplásica, una célula infectada por un virus o una célula infectada por un parásito intracelular. El acoplamiento y/o la activación de las células T las dirige a una diana específica. Activar una célula T es activar el receptor de dicha célula T. Acoplar una célula T es normalmente activar una célula T. El acoplamiento también puede dirigir una célula T ya activada a una diana especificada por el anticuerpo. Las condiciones que son permisivas para que dicha célula T se acople y/o active son normalmente condiciones de cultivo, pero también puede ser la incubación en un animal no humano. Las condiciones son tales que la célula T no se acopla en ausencia del anticuerpo. Si se miden colecciones de células T algunas de ellas pueden estar ya acopladas o activadas, siempre que la colección contenga suficientes células T que no estén acopladas o activadas.

Un anticuerpo biespecífico de la invención puede reunir dos células en estrecha proximidad que permita las interacciones entre las células mediadas por proteínas distintas del miembro de la superfamilia del receptor del TNF y la segunda proteína de membrana unida por el anticuerpo de la invención. Una de dichas interacciones es la interacción de un receptor de células T de una célula y el MHC de la otra célula.

Dichas primera y segunda células son preferiblemente células diferentes. Las diferentes células pueden expresar tanto dicha primera como segunda proteína de membrana. Normalmente, sin embargo, la primera proteína de membrana se expresa sólo en dicha primera célula y dicha segunda proteína de membrana sólo en dicha segunda célula. La actividad biológica es normalmente más estimulada si la primera célula no expresa dicha segunda proteína de membrana; dicha segunda célula no expresa dicha primera proteína de membrana; o más preferiblemente una combinación de las mismas. El miembro de la superfamilia del receptor del TNF es CD137, en cuyo caso se prefiere que dicha primera célula sea una célula inmunitaria, preferiblemente una célula T. En estos casos se prefiere que la segunda célula sea una célula aberrante, una célula tumoral o una célula inmunitaria (por ejemplo un macrófago o una célula presentadora de antígeno). Las células aberrantes son células que normalmente no están presentes en un individuo sano. Ejemplos preferentes no limitantes de tales células son células cancerosas, células infectadas por virus, células infectadas por parásitos o células inducidas para expresar la segunda proteína de membrana. Una segunda célula adecuada es también una célula inmunitaria. Ejemplos preferidos de dichas células son células dendríticas, macrófagos, otras células del linaje mieloide o células B. En algunos casos, una célula puede expresar la segunda proteína de membrana como resultado de factores supresores liberados por células vecinas tales como células inmunitarias, fibroblastos o células cancerosas. En algunas realizaciones, dicha segunda célula es una célula presentadora de antígeno que presenta un antígeno tumoral o un antígeno patógeno, como por ejemplo un antígeno vírico o un antígeno parasitario, en el contexto de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Dicho complejo MHC es preferiblemente un complejo de antígeno leucocitario humano (HLA). En este contexto, el anticuerpo de la invención puede potenciar tanto la expansión como la diferenciación de células T vírgenes frente al antígeno *in vitro*. La inducción y mejora de respuestas de células T vírgenes frente a antígenos tumorales suele dar lugar a una inmunidad tumoral más eficaz y a la erradicación de células cancerosas.

CD137 se puede expresar por células T activadas. También se encuentra en otras células tales como células dendríticas, células asesinas naturales, granulocitos y células de la pared de los vasos sanguíneos en sitios de inflamación. La proteína es conocida por su actividad coestimuladora para la activación de las células T. El ligando CD137L se expresa en monocitos, macrófagos y otras células. La unión de CD137 al ligando CD137L ejerce efectos tanto en el receptor como en la célula que contiene el ligando. La activación del ligando o del receptor se puede conseguir de varias maneras. Las formas más comunes son el recubrimiento en placas de cultivo de tejidos o el entrecruzamiento mediante anticuerpos (para una revisión véase Schwartz, 2004). La expresión de CD137 en células inmunitarias tanto innatas como adaptativas, acopladas con su capacidad para potenciar las respuestas antitumorales, lo ha establecido como diana terapéutica para mejorar la inmunidad tumoral. Varios inmunoterapéuticos dirigidos a CD137 han alcanzado el desarrollo clínico (para una revisión véase Makkouk et al 2016). La activación del receptor o del ligando parece requerir la asociación homomérica en la membrana celular para ejercer su efecto. Los anticuerpos con dos sitios de unión para CD137 son capaces de activar el receptor o el ligando. Por lo tanto, dichos anticuerpos son bivalentes para CD137. También se produjeron moléculas que sólo tienen un sitio de unión para CD137. Dichas moléculas de unión monovalente de la técnica anterior no podían activar el receptor (McNamara 2008). Por el contrario, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención es capaz de activar CD137, incluso cuando es monovalente para CD137.

En la presente invención se encontró que un anticuerpo biespecífico con sólo un sitio de unión para CD137 como miembro de la superfamilia del receptor TNF (primera proteína de membrana) puede ser activador si el

anticuerpo biespecífico también tiene un sitio de unión para PD-L1 como segunda proteína de membrana en otra célula (segunda célula).

La estimulación de la actividad de un miembro de la superfamilia de receptores del TNF en una célula normalmente requiere la unión de dos o más complejos de receptores. El ligando homotrimérico dispuesto en la membrana de la superficie de una célula normalmente lo consigue al acoplar múltiples complejos de miembros de la superfamilia de receptores de TNF en una célula vecina. Se considera que la agrupación de los complejos de la superfamilia de receptores del TNF facilita la estimulación de la actividad de la célula. Esto también se observa, por ejemplo, en los receptores artificiales que sólo tienen una parte citoplasmática del receptor CD137. La proximidad de las partes citoplasmáticas de varios receptores artificiales también estimula la célula que contiene el receptor artificial. Los anticuerpos monoespecíficos bivalentes específicos de un miembro de la superfamilia de receptores del TNF también son capaces de imitar el efecto del ligando y estimular la actividad. Se considera que los brazos del anticuerpo juntan o agrupan los receptores. Dicha actividad también se conoce como entrecruzamiento de los receptores. En ocasiones la actividad se puede estimular aún más al proporcionar un anticuerpo contra el anticuerpo, lo que proporciona entrecruzamiento adicional del receptor. Las moléculas de unión de la técnica anterior que sólo tienen un sitio de unión para un miembro de la superfamilia de receptores del TNF normalmente no son capaces de estimular la actividad. Dichas moléculas no consiguen agrupar o entrecruzar los miembros de la superfamilia de receptores del TNF. Sin embargo, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención es capaz de estimular la actividad de CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF, que incluye cuando es monovalente para dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Sin estar limitado a ninguna teoría, se considera que un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención también puede agrupar dichos complejos de receptores de la superfamilia de receptores de TNF, promoviendo de esta manera la activación de dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Esto es particularmente cierto cuando la segunda proteína de membrana unida por un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es PD-L1.

En un aspecto de la presente invención, PD-L1 como la segunda proteína de membrana está presente en la membrana celular como parte de una proteína multimérica que comprende dos o más instancias de dicha segunda proteína de membrana. Dichas proteínas multiméricas pueden proporcionar dos o más epítopos para el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo biespecífico de la invención. En tal caso, el miembro de la superfamilia del receptor de TNF unido en la otra célula se agrupará y estimulará la actividad de la célula que contiene el receptor de TNF. Un anticuerpo biespecífico de la invención puede forzar la proximidad de CD 137 como miembros de la superfamilia de receptores de TNF a través de la unión a PD-L1 como otra proteína en una célula diferente. Una característica también denominada entrecruzamiento trans en contraposición al entrecruzamiento cis por moléculas de unión que se unen a dos o más instancias del miembro de la superfamilia del receptor de TNF en la misma célula. En algunas realizaciones, la segunda proteína de membrana es un homodímero o un homotrímero. Un homodímero es una proteína compuesta por dos unidades de polipéptido idénticas. Un homotrímero es una proteína compuesta por tres unidades de polipéptido idénticas. Sin estar limitado a ninguna teoría, se considera que los epítopos del sitio de unión a antígeno de la segunda proteína de membrana se unen colectivamente a una serie de moléculas de unión. Éstas funcionan así como un anclaje que fuerza la proximidad de dos o más miembros de la superfamilia de receptores del TNF. La proximidad es suficiente cercana para estimular la actividad del CD 137 como miembro de la superfamilia de receptores del TNF en una célula.

En otra realización, dicha segunda proteína de membrana es una proteína que está presente en una o más zonas discretas de la membrana celular. Las membranas celulares no proporcionan una distribución homogénea de todos los componentes de la membrana celular. Actualmente se sabe que las membranas celulares tienen zonas en las que uno o más componentes de la membrana celular están presentes con más frecuencia que otras partes de la membrana (para una revisión véase Vereb, G., et al. 2003 Proc. Natl. Acad. Sci. 100.14: 8053-8058). Dicha zona es preferiblemente una agrupación de proteínas, un dominio, un microdominio o un compartimento en la membrana celular, preferiblemente una sinapsis inmunológica. Sin estar limitado a ninguna teoría, se considera que la distribución no aleatoria facilita la proximidad cercana del miembro de la superfamilia del receptor del TNF.

En otras realizaciones, la estimulación de la actividad del miembro de la superfamilia de receptores de TNF de acuerdo con la invención en una célula se consigue al proporcionar dos o más moléculas de unión de acuerdo con la invención que se unen al mismo miembro de la superfamilia de receptores de TNF (primera proteína de membrana) y a la misma segunda proteína de membrana. Dichas realizaciones que implican dos o más moléculas de unión también se denominan realizaciones de Oligoclonics®. Como se muestra por ejemplo en las Figuras 15 y 16, dichas realizaciones de Oligoclonics® pueden dar lugar a la activación de células T. En los documentos WO 2013/157953 y WO2004/009618 se divulgan métodos generales para fabricar dichos productos de Oligoclonics®. El término "Oligoclonics" es una marca registrada, indicada por ®. En una realización de Oligoclonics® al menos dos de las moléculas de unión de acuerdo con la invención se unen a diferentes epítopos en dicha primera proteína de membrana; a diferentes epítopos en dicha segunda proteína de membrana; o a diferentes epítopos en dicha primera proteína de membrana y a diferentes epítopos en dicha segunda proteína de membrana. Una realización de Oligoclonics® permite la unión de dos o más moléculas de unión a la misma molécula de la primera y/o segunda proteína de membrana, estimulando de esta manera la

actividad de un miembro de la superfamilia de receptores del TNF en una célula. Se prefiere que al menos dos de las moléculas de unión de acuerdo con la invención se unan a diferentes epítomos de dicha segunda proteína de membrana; o se unan a diferentes epítomos de dicha primera proteína de membrana y a diferentes epítomos de dicha segunda proteína de membrana. En una realización particularmente preferida, las al menos dos moléculas de unión de acuerdo con la invención se unen al mismo epítomo en dicha primera proteína de membrana y a diferentes epítomos en dicha segunda proteína de membrana. En algunas realizaciones de Oligoclonics® las dos moléculas de unión de acuerdo con la invención bloquean la interacción ligando-miembro de la superfamilia de receptores TNF. En otras realizaciones de Oligoclonics® las dos moléculas de unión de acuerdo con la invención no bloquean la interacción ligando-miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Los diferentes epítomos unidos por las moléculas de unión de acuerdo con la invención en una primera y segunda proteína de membrana son preferiblemente tales que es posible la unión simultánea de una molécula de unión que se une a uno de los epítomos y una molécula de unión que se une al epítomo diferente. En una realización preferida, los epítomos diferentes son epítomos que no compiten entre sí. En una realización preferida, una primera y una segunda de dichas moléculas de unión de acuerdo con la invención se pueden unir al mismo dominio de CD137. En una realización preferida, dicha primera y segunda molécula de unión de acuerdo con la invención se unen al mismo epítomo en CD137.

La segunda proteína de membrana es PD-L1. El dominio variable que se une a la segunda proteína de membrana bloquea la unión de PD-L1 al socio de unión de la misma. De este modo se reduce una posible señal cohibitoria proporcionada por la segunda proteína de membrana a la primera célula.

PD-L1 como segunda proteína de membrana es miembro de un par de unión. Por ejemplo, pero no de acuerdo con la presente invención, el receptor de EGF (EGFR) y EGF forman un par de unión. Otros ejemplos no limitantes de pares de unión adecuados son HER3 y heregulina; LGR5-Rspondina; LGR4-Rspondina; o PD-L1 como ligando miembro de la familia B7 y el receptor del mismo de la familia CD28. Un anticuerpo biespecífico como el descrito en el presente documento bloquea la unión de la segunda proteína de membrana al miembro complementario del par de unión. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención estimulan normalmente la actividad de un miembro de la superfamilia de receptores de TNF en la célula y bloquean una actividad de la segunda proteína de membrana de la presente invención. Dichos anticuerpos biespecíficos son particularmente adecuados para situaciones en las que la segunda célula es una célula tumoral, o para el tratamiento de individuos con cáncer. De acuerdo con la invención reivindicada, la segunda proteína de membrana es PD-L1 como miembro de la familia B7 y dicho anticuerpo biespecífico bloquea preferiblemente la unión de dicho miembro de la familia B7 a su receptor normal de la familia CD28. La segunda proteína de membrana es PD-L1 y dicho anticuerpo biespecífico bloquea preferiblemente la unión de PD-L1 a PD-1.

Una célula tiene normalmente un miembro de la superfamilia de receptores TNF en la membrana si el miembro es expresado por la célula. La expresión se puede medir de varias maneras. A menudo se utiliza la PCR cuantitativa específica de ARN. También a menudo se utiliza la inmunohistoquímica o el análisis FACS mediante inmunofluorescencia.

Un sistema adecuado en el que se proporcionan la primera célula y la segunda célula es un cultivo celular. Otro sistema adecuado es un animal no humano que comprende la primera célula y la segunda célula. Otros sistemas adecuados son los sistemas *ex vivo* en los que las células se mantienen en forma activa pero en los que no se facilita necesariamente el crecimiento de las células. Una primera y una segunda célula se pueden incubar juntas, por ejemplo, bajo condiciones de ensayo que no faciliten necesariamente el crecimiento pero permitan medir la actividad biológica.

Incubar dicho sistema bajo condiciones permisivas para las células que expresan dicha actividad biológica mediada por la unión de dicha primera proteína de membrana y dicha segunda proteína de membrana significa que el sistema se mantiene en condiciones en las que la primera y la segunda célula pueden exhibir una actividad biológica como resultado de los socios de unión. La incubación *in vivo* o *in vitro* no tiene que implicar más que el paso de un tiempo suficiente para permitir que la actividad biológica se haga evidente.

Un dominio variable que no bloquea la unión de un par de unión específico de proteínas de membrana como se describe en el presente documento no reduce normalmente la unión del par cuando se compara con la unión en ausencia del dominio variable. Esto se mide preferiblemente en un ensayo *in vitro*. Normalmente, esto se hace al incubar el dominio variable con la proteína de membrana a la que se puede unir y posteriormente incubar la mezcla con el otro miembro del par. La unión del par se compara entonces con la unión del par en ausencia del dominio variable. Se considera que un dominio variable no bloquea la unión de un par específico de proteínas de membrana si reduce la unión del par en no más del 50 %, preferiblemente no más del 40 %, preferiblemente no más del 30 %, preferiblemente no más del 20 %, y más preferiblemente no más del 10 %, en comparación con la unión en ausencia del dominio variable. La unión por un dominio variable y el bloqueo o no bloqueo de la unión al otro miembro del par de unión se define en el presente documento como el bloqueo obtenido utilizando un anticuerpo monoclonal bivalente que comprende dos de los mismos de dichos dominios variables. El bloqueo o no bloqueo se define como el obtenido con un anticuerpo mono-específico bivalente que comprende dichos dos de los mismos de dichos dominios variables.

Los dominios variables específicos que se pueden unir a un dominio extracelular de CD137 y que no bloquean la unión de CD137 a CD137L son dominios variables que comprenden la secuencia de aminoácidos del VH de MF6860; MF6848; MF6805; MF6832; MF6870; MF6862; MF6875; o MF6873.

- 5 Los dominios variables específicos que se pueden unir a un dominio extracelular de PD-L1 y que no bloquean la unión de PD1 a PD-L1 son dominios variables que comprenden la secuencia de aminoácidos del VH de MF5361.

- 10 Los aspectos funcionales de los dominios variables en especie, no necesariamente en cantidad, tales como la unión a un antígeno, la capacidad de bloqueo de la interacción del receptor ligando, la actividad biológica de un dominio variable, etc., se pueden determinar de diversas maneras. Los formatos adecuados son un fragmento Fab o un anticuerpo. Un formato de anticuerpo adecuado es un anticuerpo bivalente monoespecífico que comprende dos de los dominios variables. Otro formato adecuado es, por ejemplo un anticuerpo biespecífico que comprenda el dominio variable que se va a probar y otro dominio variable. El otro dominio variable es preferiblemente un dominio variable con una especificidad neutra con respecto al ensayo que se va a realizar. Un dominio variable neutro adecuado es un dominio variable que pueda unirse al toxoide tetánico.

- 15 Un anticuerpo biespecífico de la invención comprende preferiblemente un dominio variable que bloquea la unión de CD137 como su proteína de membrana diana de la superfamilia de receptores de TNF a un socio de unión del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende un dominio variable que bloquea la unión de CD137 como su proteína de membrana diana de la superfamilia de receptores de TNF a un socio de unión del mismo, y que, cuando se proporciona en un anticuerpo bivalente monoespecífico que
20 comprende dos de dichos dominios variables que se unen a CD137, no estimula la actividad de CD137 en una célula. En algunas realizaciones, el anticuerpo biespecífico de la invención comprende un dominio variable que bloquea la unión de CD137 a CD137L, y que, cuando se proporciona en un anticuerpo bivalente monoespecífico que comprende dos de dichos dominios variables, no estimula la actividad de CD137 en una célula.

- 25 La invención también proporciona un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para uso en un método para el tratamiento de un individuo que tiene un cáncer, el método comprende administrar un anticuerpo biespecífico de la invención, al individuo que lo necesita. El individuo es preferiblemente un individuo que tiene cáncer. En algunas realizaciones el cáncer es un cáncer que comprende células cancerosas que expresan dicha segunda proteína de membrana. En algunas realizaciones el cáncer es un cáncer que comprende células cancerosas que expresan un miembro de la familia B7. En algunas realizaciones, las células inmunitarias y/o
30 las células del linaje mieloide de dicho individuo expresan dicha segunda proteína de membrana, preferiblemente un miembro de la familia B7. En algunas realizaciones, las células presentadoras de antígenos (APC) de dicho individuo expresan dicha segunda proteína de membrana, preferiblemente un miembro de la familia B7. De acuerdo con estas realizaciones, las células cancerosas pueden o no expresar dicha segunda proteína de membrana. Cuando las APC expresan dicha segunda proteína de membrana, los antígenos de dicho cáncer son presentados por dichas APC del individuo y la transactivación de las células inmunitarias (preferiblemente células T) se puede inducir por un anticuerpo de la invención, que es capaz de unirse a una célula inmunitaria y a una célula inmunitaria, APC o célula tumoral del individuo. En algunas realizaciones, se
35 utiliza el anticuerpo biespecífico de la invención que se une a CD137 y PD-L1 como miembro de la familia B7. Dicho anticuerpo de la invención puede transactivar una célula inmunitaria mediante la unión de una célula inmunitaria que exprese CD137 (preferiblemente una célula T) y una célula tumoral y/o una célula inmunitaria y/o una célula del linaje mieloide y/o una APC que expresa dicho miembro de la familia B7.

- 40 El cáncer es preferiblemente un adenocarcinoma. Los cánceres preferidos son cáncer colorrectal; cáncer de páncreas; cáncer de pulmón; cáncer de mama; cáncer de hígado; cáncer de próstata; cáncer de ovario; cáncer de cuello uterino; cáncer de endometrio; cáncer de cabeza y cuello; melanoma; cáncer de testículo; cáncer urotelial; cáncer renal; cáncer de estómago; o cáncer carcinoide. En una realización preferida, el cáncer es cáncer colorrectal; cáncer de páncreas; cáncer de pulmón; cáncer de mama; cáncer de hígado; cáncer de
45 próstata; cáncer de ovario; cáncer de cuello uterino; cáncer de endometrio; cáncer de cabeza y cuello; o melanoma. En una realización particularmente preferida, el cáncer es cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de mama o cáncer de hígado. En una realización particularmente preferida, el cáncer es un cáncer gastrointestinal. En una realización preferida, el cáncer es cáncer colorrectal. En esta realización, el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo con un dominio variable que se puede unir a CD137 y un dominio variable que se puede unir a PD-L1. El dominio variable que se une a CD137 bloquea la unión de CD137 al ligando CD137. El dominio variable que se une a PD-L1 bloquea preferiblemente la unión de PD-1 a PD-L1.

- 50 Además se proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un individuo contra una célula aberrante en dicho individuo, el método comprende proporcionar a dicho individuo un anticuerpo biespecífico de la invención. La célula aberrante es preferiblemente una célula de cáncer, una célula infectada por un virus, un parásito o una célula infectada por un parásito. En una realización preferida la célula es una célula de cáncer o una célula neoplásica. En esta realización el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de acuerdo con la invención. El dominio variable que une CD137 bloquea la unión de CD137 al ligando CD137. El dominio variable
55 que une PD-L1 preferiblemente bloquea la unión de PD-1 a PD-L1.

Una neoplasia es un crecimiento anormal de tejido y cuando también forma una masa se denomina comúnmente tumor. Una neoplasia en la presente invención normalmente forma una masa. Una célula neoplásica es una célula de una neoplasia que ha formado una masa. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica las neoplasias en cuatro grupos principales: neoplasias benignas, neoplasias in situ, neoplasias malignas, y neoplasias de comportamiento incierto o desconocido. Las neoplasias malignas también se conocen simplemente como cánceres.

Estimular una respuesta inmunitaria abarca inducir una respuesta inmunitaria y mejorar una respuesta inmunitaria ya existente. La respuesta inmunitaria en un individuo se puede medir midiendo, en su caso, la carga tumoral del individuo, la carga vírica del individuo y la carga parasitaria del individuo.

Dicha célula infectada por virus es preferiblemente una célula infectada por un virus de inmunodeficiencia, un virus del herpes, preferiblemente un virus del herpes simple, un virus de la varicela-zoster, un citomegalovirus o un virus de Epstein-Barr, un virus del papiloma, un virus de la hepatitis, preferiblemente un virus de la hepatitis A, B o C, un virus del sarampión o un adenovirus. El virus es preferiblemente un virus conocido por su capacidad de persistir en un individuo. Las infecciones persistentes se caracterizan por el hecho de que el virus no se elimina, sino que permanece en células específicas de los individuos infectados. Las infecciones persistentes pueden implicar estadios de infección tanto silenciosa como productiva sin destruir rápidamente o incluso producir un daño excesivo de las células huésped. La interacción persistente virus-huésped puede ser una infección latente, crónica y/o lenta.

Una célula infectada por un parásito es una célula infectada por un parásito intracelular. Dichos parásitos son microorganismos parásitos capaces de crecer y reproducirse dentro de las células de un huésped. Algunos parásitos intracelulares también pueden vivir fuera de una célula. Dichos parásitos se denominan parásitos intracelulares facultativos. Ejemplos no limitantes son *Listeria monocytogenes*, *Legionella*, ciertas especies de micobacterias y *Cryptococcus neoformans*. Los parásitos intracelulares preferidos son parásitos que no pueden crecer fuera de las células huésped, ejemplos preferidos son *Chlamydia*, y especies estrechamente relacionadas, ciertas especies de micobacterias tales como *Mycobacterium leprae*, ciertos protozoos, que incluyen: Apicomplexans (*Plasmodium* spp., *Toxoplasma gondii* y *Cryptosporidium parvum* y tripanosomátidos.

La divulgación también proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo cuya molécula de ácido nucleico no forma parte de las reivindicaciones adjuntas. Dicha molécula de ácido nucleico (normalmente una molécula de ácido nucleico *in vitro*, aislada o recombinante) codifica preferiblemente cualquiera de las regiones variables de cadena pesada como se representa en la Figura 3 o una región variable de cadena pesada como se representa en la Figura 3 que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o combinación de las mismas. En un aspecto preferido, dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia como se representa en la Figura 3. Dicha molécula de ácido nucleico utiliza preferiblemente codones optimizados para la expresión en la célula productora de anticuerpos que se va a utilizar. Dicho ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada como se representa en la Figura 3 o una región variable de cadena pesada como se representa en la Figura 3 que tiene 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas está optimizado en codones para la expresión en una célula humana, preferiblemente Per.C6TM; o un hámster chino, preferiblemente CHO. La divulgación proporciona además una molécula de ácido nucleico que codifica para la mencionada región variable de cadena pesada junto con una región constante de cadena pesada de la Figura 2. Dicha molécula de ácido nucleico es normalmente, pero no exclusivamente, un ácido ribonucleico (ARN) o un ácido desoxirribonucleico (ADN). Los expertos en la materia disponen de ácidos nucleicos alternativos. Una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento, se encuentra, por ejemplo en una célula. Cuando dicha molécula de ácido nucleico se expresa en dicha célula, dicha célula puede producir un anticuerpo de acuerdo con la invención. Se produce un anticuerpo cuando dicha célula produce una cadena pesada y una cadena ligera. La célula comprende preferiblemente una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo que, cuando se combina con una cadena ligera común, se puede unir a dicha primera proteína de membrana. Dicha célula comprende preferiblemente además una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de anticuerpos que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpos que, cuando se combina con una cadena ligera común, se puede unir a dicha segunda proteína de membrana. Dicha célula comprende preferiblemente además una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera común. Dicha célula es preferiblemente una célula animal, más preferiblemente una célula de mamífero, más preferiblemente una célula de primate, y lo más preferiblemente una célula humana.

La divulgación proporciona además una célula que comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento, cuya célula no es parte de las reivindicaciones adjuntas. También se proporciona una célula que comprende una o más moléculas de ácido nucleico que solas o juntas codifican un anticuerpo como se describe en el presente documento, cuya célula no forma parte de las reivindicaciones adjuntas. La una o más moléculas de ácido nucleico son moléculas de ácido nucleico expresables, lo que significa que contienen las señales requeridas *in cis* para la transcripción del ARN y la traducción de los dominios codificantes de proteínas. Preferiblemente, dicha célula (normalmente una célula *in vitro*, aislada o recombinante) produce dicho anticuerpo. En un aspecto preferido, dicha célula es una célula de hibridoma, una célula de ovario de hámster

chino (CHO), una célula NS0 o una célula PER-C6TM. En un aspecto particularmente preferido, dicha célula es una célula CHO. Además, se proporciona un cultivo celular que comprende dicha célula. Varias instituciones y empresas han desarrollado estirpes celulares para la producción a gran escala de anticuerpos, por ejemplo para uso clínico. Ejemplos no limitantes de tales estirpes celulares son las células CHO, las células NS0 o las células PER.C6TM. Estas células también se utilizan para otros fines tales como la producción de proteínas. Las estirpes celulares desarrolladas para la producción a escala industrial de proteínas y anticuerpos se denominan en el presente documento estirpes celulares industriales. Por tanto, en un aspecto preferido, la divulgación proporciona el uso de una estirpe celular desarrollada para la producción a gran escala de un anticuerpo como se describe en el presente documento. La divulgación proporciona además una célula para producir un anticuerpo que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una VH, una VL, y/o una cadena pesada como se representa en las Figuras 3, 1 y 2. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia como se representa en las Figuras 1 y 2.

La divulgación proporciona además un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula como se describe en el presente documento y cosechar dicho anticuerpo a partir de dicho cultivo, cuyo método no es parte de las reivindicaciones adjuntas. Preferiblemente, dicha célula se cultiva en un medio libre de suero. Preferiblemente, dicha célula está adaptada para el crecimiento en suspensión. Se proporciona además un anticuerpo obtenible por un método para producir un anticuerpo como se describe en el presente documento. El anticuerpo se purifica preferiblemente a partir del medio de cultivo. Preferiblemente, dicho anticuerpo se purifica por afinidad.

Una célula de la divulgación es, por ejemplo una estirpe celular de hibridoma, una célula CHO, una célula 293F, una célula NS0 o cualquier otro tipo celular conocido en la técnica por su idoneidad para la producción de anticuerpos con fines clínicos, en particular para la producción de anticuerpos utilizados para la administración en humanos. En un aspecto particularmente preferido, dicha célula es una célula humana, preferiblemente una célula que se transforma por una región E1 de adenovirus o un equivalente funcional de la misma. Un ejemplo preferido de dicha estirpe celular es la estirpe celular PER.C6TM o equivalente de la misma. En un aspecto particularmente preferido, dicha célula es una célula CHO o una variante de la misma que hace uso de un sistema de vector de Glutamina sintetasa (GS) para la expresión de un anticuerpo.

Un anticuerpo biespecífico de la invención puede comprender además una etiqueta, preferiblemente una etiqueta para formación de imagen *in vivo*. Dicha etiqueta normalmente no es necesaria para aplicaciones terapéuticas. En un entorno de diagnóstico, por ejemplo una etiqueta puede ser útil. Por ejemplo en la visualización de células diana en el cuerpo. Varias etiquetas son adecuadas y muchas son bien conocidas en la técnica. En una realización preferida, la etiqueta es una etiqueta radiactiva para la detección. En otra realización preferida, la etiqueta es una etiqueta infrarroja. Preferiblemente, la etiqueta infrarroja es adecuada para la formación de imágenes *in vivo*. El experto en la materia dispone de varias etiquetas infrarrojas. Las etiquetas infrarrojas preferidas son por ejemplo IRDye 800; IRDye 680RD; IRDye 680LT; IRDye 750; IRDye 700DX; IRDye 800RS IRDye 650; IRDye 700 fosforamidita; IRDye 800 fosforamidita (LI-COR USA; 4647 Superior Street; Lincoln, Nebraska).

La cantidad de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención que se debe administrar a un paciente se encuentra normalmente en la ventana terapéutica, lo que significa que se utiliza una cantidad suficiente para obtener un efecto terapéutico, mientras que la cantidad no supera un valor umbral que conduce a un grado inaceptable de efectos secundarios. Cuanto menor sea la cantidad de anticuerpo necesaria para obtener un efecto terapéutico deseado, mayor será normalmente la ventana terapéutica. Por lo tanto, se prefiere un anticuerpo de acuerdo con la invención que ejerza suficientes efectos terapéuticos a una dosificación baja. La dosificación puede estar en el rango del régimen de dosificación de Nivolumab. La dosificación también puede ser inferior.

En un entorno de supresión tumoral, se espera que la expresión de PD-L1 en las células circundantes alcance un umbral de densidad que dará lugar a la activación de CD137 en las células T como se describe en el Ejemplo 8 (Figura 28A y 28B). Como tal el anticuerpo biespecífico podrá activar células T dentro del tumor y no actuar - o hacerlo en un grado significativamente menor - sobre células que expresen niveles bajos de PD-L1 en la superficie celular. En caso de que el anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 contenga un brazo Fab bloqueante de PD-L1, el anticuerpo superará además el bloqueo PD-1/PD-L1. Al actuar en 'trans', el anticuerpo CD137xPD-L1 liberará el bloqueo PD-1/PD-L1 y activará simultáneamente la célula T al activar CD137. Como resultado, un anticuerpo CD137xPD-L1 puede mejorar las respuestas de las células T locales que conducen a la liberación de una plétora de citocinas (Ejemplo 9) que a su vez pueden activar otras células inmunitarias en el microambiente tumoral y superar, al menos en parte, la inmunosupresión local en el tumor. Los presentes inventores han demostrado que un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención a menudo tiene mejores propiedades activadoras de células T en comparación con anticuerpos que se basan en anticuerpos de referencia de la técnica anterior con el mismo tipo de especificidad, tal como por ejemplo anticuerpos basados en Urelumab (anti-CD137) o basados en Atezolizumab (anti-PD-L1). En los Ejemplos, se ha logrado una actividad activadora de células T más fuerte con un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención en comparación con una mezcla de dos de dichos anticuerpos basados en puntos de referencia. Esto se muestra, por ejemplo en los ensayos de transactivación de células T y los ensayos de estimulación SEB de los presentes

Ejemplos. También se ha demostrado que un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención es capaz de revertir la inmunosupresión inducida por macrófagos M2 asociados a tumores y es capaz de (re)estimular células T específicas de tumores aisladas de tumores de pacientes *in vitro*. Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención puede (re)estimular células T de memoria efectoras CD4+ específicas de tumor, células T de memoria efectoras CD8+ específicas de tumor y células T diferenciadas terminalmente CD8+ específicas de tumor, mientras que un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia basado en Atezolizumab normalmente sólo (re)estimula células T CD4+. Por lo tanto, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención tiene una potencia de (re)estimulación de un subconjunto más variable de células T específicas de antígeno en comparación con el anticuerpo de referencia, que incluyen las células T CD8+.

Además de revigorizar las respuestas de células T citotóxicas existentes contra el tumor mediante la activación de células T CD8 experimentadas en antígenos, los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 pueden mejorar las respuestas antitumorales de células T CD8+ de novo. Los (neo)antígenos tumorales liberados al entorno por las células tumorales moribundas o por las células tumorales engullidas por las células presentadoras de antígenos son transportados a los ganglios linfáticos de drenaje o a las estructuras linfoides terciarias, que son formaciones linfoides ectópicas encontradas en los tejidos tumorales. En el entorno tumoral local, los antígenos tumorales se presentan a las células T CD8+ vírgenes que se expandirán y diferenciarán tras el reconocimiento del antígeno.

Como se muestra en los Ejemplos, un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención puede mejorar la expansión de células T tras el cebado de células T CD8+ en mayor medida que los anticuerpos de referencia basados en Urelumab o basados en Atezolizumab. En los Ejemplos se ha demostrado que un anticuerpo de acuerdo con la invención puede inducir tanto la expansión como la diferenciación de células T CD8+ específicas de antígeno, en mayor medida que una mezcla de anticuerpos de referencia basados en Urelumab y basados en Atezolizumab, lo que facilitará la generación de grandes poblaciones de células T destructoras de memoria y diferenciadas terminalmente específicas de tumor.

Un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención puede tener menos efectos secundarios que una combinación de anticuerpos monoespecíficos bivalentes con los dominios variables. Las combinaciones de anticuerpos que bloquean moléculas inhibitoras y/o coestimuladoras benefician a los pacientes que no responden a las inmunoterapias existentes. Sin embargo, se ha mostrado que el bloqueo doble de los receptores inmunomoduladores (iMOD) aumenta la toxicidad relacionada con la inmunidad. Un anticuerpo de acuerdo con la invención es adecuado para abordar el bloqueo doble de iMOD, ya que pueden ejercer actividades funcionales que no pueden ser reproducidas por combinaciones de anticuerpos monoclonales, y pueden dirigirse más selectivamente a poblaciones celulares específicas, lo que reduce las responsabilidades de seguridad en los pacientes. Sin estar limitados a ninguna teoría, se considera que la menor probabilidad de efectos secundarios adversos de un anticuerpo biespecífico de la invención, en comparación con (una combinación de) anticuerpos monoespecíficos, se debe al menos en parte a que un anticuerpo biespecífico de la invención exhibe normalmente activación de células T *en trans*, mientras que tiene una baja actividad de activación de células T *in cis*. Se prefiere el uso de un anticuerpo con baja actividad de activación de células T *in cis* en el contexto de la presente invención porque esto disminuye la respuesta potencial de células T no específica. Un anticuerpo o anticuerpo biespecífico o una parte funcional, derivado y/o análogo del mismo de acuerdo con la invención tiene menos toxicidad relacionada con el sistema inmunitario que una combinación de anticuerpos monoespecíficos bivalentes con los dominios variables.

En vista de lo anterior, se prefiere un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención para aplicaciones terapéuticas.

Los anticuerpos se produjeron como anticuerpos biespecíficos al clonarlos en vectores de expresión complementarios que contienen mutaciones en la región CH3 que impulsa la heterodimerización de las cadenas pesadas. Muchos anticuerpos biespecíficos se produjeron a pequeña escala y se probaron en ensayos de unión y funcionales en estirpes celulares cancerosas. Un anticuerpo de la invención, en particular un anticuerpo biespecífico de la invención puede combinar perfiles de baja toxicidad con alta eficacia. Un anticuerpo de la invención puede ser útil en varios tipos y líneas de terapias inmunodirigidas. Un anticuerpo de la invención puede tener una ventana terapéutica aumentada en comparación con un anticuerpo que se une al mismo antígeno(s) con ambos brazos.

Se proporciona además un uso de un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de células aberrantes, un tumor y/o la formación de metástasis. El tumor del que se originan dichas metástasis es preferiblemente un tumor que es positivo para dicha segunda proteína de membrana celular, preferiblemente positivo para un miembro de la familia B7 de acuerdo con la presente invención.

Los anticuerpos biespecíficos de la invención se pueden producir a niveles > 50 mg/l después de la transfección transitoria en células 293F en suspensión. Los anticuerpos biespecíficos se pueden purificar a más del 98 %

de pureza con rendimientos > 70 %. Los estudios de caracterización analítica muestran perfiles de anticuerpos IgG1 biespecíficos que son comparables a los IgG1 mono-específicos bivalentes.

La invención de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas proporciona un anticuerpo biespecífico que se puede unir a una parte extracelular de CD137 y una parte extracelular de PD-L1. Dicho anticuerpo biespecífico comprende dos sitios de unión a antígeno. Dicho anticuerpo biespecífico comprende un sitio de unión a antígeno que puede unir CD137 y un sitio de unión a antígeno que puede unir PD-L1. En algunas realizaciones preferidas, la parte de unión a antígeno de dicho anticuerpo biespecífico de la invención consiste en un dominio variable de inmunoglobulina que puede unir una parte extracelular de CD137 y un dominio variable de inmunoglobulina que puede unir PD-L1. Dicho anticuerpo biespecífico es preferiblemente monovalente para CD137 y monovalente para PD-L1. El sitio de unión a antígeno que puede unir CD137 es capaz de bloquear la unión de CD137 a CD137L. En algunas realizaciones el sitio de unión a antígeno que puede unir PD-L1 es capaz de bloquear la unión de PD-L1 a PD-1. En algunas realizaciones el sitio de unión a antígeno que puede unir PD-L1 no es capaz de bloquear la unión de PD-L1 a PD-1. Dicho anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa. Dicho anticuerpo biespecífico es un anticuerpo de longitud completa, es decir una IgG, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de longitud completa, preferiblemente una IgG1 de longitud completa o una IgG4 de longitud completa.

También se proporciona un método para el tratamiento de un individuo que tiene un cáncer, el método comprende administrar un anticuerpo biespecífico de la invención al individuo que lo necesita.

La invención además proporciona un anticuerpo biespecífico de la invención para uso en el tratamiento de un individuo que tiene cáncer.

De acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, la invención proporciona un método para estimular la actividad de CD137 como el miembro de la superfamilia de receptores de TNF en una célula que comprende proporcionar una primera célula y una segunda célula, en la que dicha primera célula tiene CD137 como dicho miembro en la membrana celular y dicha segunda célula tiene PD-L1 como segunda proteína de membrana en la membrana celular, el método comprende poner en contacto dichas células con un anticuerpo biespecífico que comprende dos dominios variables, en el que dicho anticuerpo biespecífico es preferiblemente un anticuerpo de longitud completa, en el que el dominio variable que une una parte extracelular de dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF se define como un dominio variable que, cuando está en un formato de anticuerpo mono-específico bivalente que comprende dos de dichos dominios variables que se unen a dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF, no estimula la actividad de dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF en una célula, en el que el miembro de la superfamilia de receptores de TNF es CD137 y el miembro de la familia B7 es PDL1, y en el que el método no comprende el tratamiento en un cuerpo humano o animal. En algunas realizaciones, dicho método es un método in vitro. Dicho anticuerpo biespecífico es monovalente para dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF y monovalente para dicha segunda proteína de membrana. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo biespecífico es una IgG de longitud completa, es decir una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de longitud completa, preferiblemente una IgG1 de longitud completa o una IgG4 de longitud completa.

Dicha primera célula preferiblemente no expresa significativamente dicha segunda proteína de membrana en la membrana celular. Dicha segunda proteína de membrana es preferiblemente una proteína que está presente en una o más zonas en la membrana celular. Dicha zona es preferiblemente un agrupamiento, dominio, microdominio o compartimiento en la membrana celular, preferiblemente una sinapsis inmunológica. Dicha segunda proteína de membrana está presente preferiblemente en la membrana celular como una parte de una proteína multimérica que comprende dos o más instancias de dicha segunda proteína de membrana. En algunas realizaciones dicha segunda proteína de membrana está presente en la membrana celular como una parte de un homodímero o a homotrímero. La segunda proteína de membrana es PD-L1. El dominio variable que une el miembro de la superfamilia de receptores de TNF, bloquea la unión de un ligando al miembro. El dominio variable que une una parte extracelular de CD137 como miembro de la superfamilia de receptores de TNF se define como un dominio variable que, cuando está en un formato de anticuerpo mono-específico bivalente que comprende dos de dichos dominios variables que se unen a CD137, no estimulan la actividad de CD137 o OX40, respectivamente, en una célula. Un método preferiblemente comprende además proporcionar un anticuerpo biespecífico adicional que comprende un sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF y un sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de dicha segunda proteína de membrana, en la que dichos primer y segundo anticuerpos biespecíficos unen:

- diferentes epítomos en dicha primera proteína de membrana;
- diferentes epítomos en dicha segunda proteína de membrana; o
- diferentes epítomos en dicha primera proteína de membrana y diferentes epítomos en dicha segunda proteína de membrana;

el método comprende además incubar dicha primera y segunda célula con dichos primer y segundo anticuerpos biespecíficos, estimulando de esta manera la actividad de dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF en dicha primera célula. En algunas realizaciones, dicho método es un método *in vitro*. El miembro de la superfamilia de receptores de TNF es CD137 o OX40. En algunas realizaciones dicho primer y dicho segundo anticuerpo biespecífico cada uno comprende un sitio de unión a antígeno que puede unir dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF. Dicha segunda proteína de membrana es PD-L1. Dicho primer y/o dicho anticuerpo biespecífico son preferiblemente monovalentes para dicho miembro de la superfamilia de receptores de TNF y monovalente para dicha segunda proteína de membrana, preferiblemente monovalente para dicho miembro de la familia B7. Dicho primer y/o dicho anticuerpo biespecífico es/son preferiblemente un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, dicho segundo anticuerpo biespecífico es una IgG de longitud completa, es decir una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de longitud completa, preferiblemente una IgG1 de longitud completa o una IgG4 de longitud completa.

Los sitios de unión a antígeno del primer y segundo anticuerpo biespecífico que pueden unir dicha segunda proteína de membrana, preferiblemente unen diferentes epítomos en la parte extracelular de dicha segunda proteína de membrana. Los diferentes epítomos en la parte extracelular de dicha segunda proteína de membrana son preferiblemente epítomos no competidores.

La PD-L1 como la segunda proteína de membrana preferiblemente no se expresa en un grado significativo en una célula T. PD-L1 se expresa preferiblemente en una célula inmunitaria, una célula del linaje mieloide, una célula presentadora de antígeno, una célula tumoral, una célula infectada por virus o una célula infectada por parásitos. Preferiblemente PD-L1 presente en una o más zonas en la membrana celular. La zona es preferiblemente un agrupamiento, dominio, micro-dominio o compartimiento en la membrana celular, preferiblemente una sinapsis inmunológica. En algunas realizaciones PD-L1 es una proteína que está presente en la membrana celular como una parte de una proteína multimérica que comprende dos o más de dicha segunda proteína de membrana. En algunas realizaciones PD-L1 está presente en la membrana celular como una parte de un homodímero o un homotrímero. La segunda proteína de membrana es PD-L1. El dominio variable que une dicho CD 137 bloquea la unión de un ligando al miembro. El dominio variable que une una parte extracelular de dicho CD137 se define como un dominio variable que, cuando está en un formato de anticuerpo monoespecífico bivalente que comprende dos de dichos dominios variables que se unen a dicho CD137 o OX40, no estimulan la actividad de CD137 o OX40, respectivamente, en una célula. Dicho anticuerpo biespecífico es preferiblemente monovalente para CD137 y monovalente para PD-L1. Dicho anticuerpo biespecífico es preferiblemente un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, dicho anticuerpo biespecífico es una IgG de longitud completa, es decir una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de longitud completa, preferiblemente una IgG1 de longitud completa o una IgG4 de longitud completa.

La divulgación también proporciona una composición o kit de partes que comprende dos o más de los anticuerpos biespecíficos de la invención, en los que los sitios de unión a antígeno que se pueden unir a CD137 de un primer y un segundo anticuerpo biespecífico se unen a diferentes epítomos en dicho CD137.

Un anticuerpo que se define por una secuencia MF como se indica a continuación es preferiblemente un anticuerpo biespecífico que tiene dos dominios variables diferentes, en el que uno de estos dominios variables comprende la secuencia indicada.

Un anticuerpo biespecífico como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto, comprende un dominio variable que se puede unir a una parte extracelular de CD137 comprende la secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable de MF6754; MF6763; MF6785; o MF6797.

Un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable que se puede unir a una parte extracelular de PD-L1 preferiblemente comprende una región variable de cadena pesada con una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la región de cadena pesada variable de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5424; MF5561; MF5439; MF5553; MF5594; MF5426; MF5442 o MF5361 (Figura 3).

Un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable que se puede unir a una parte extracelular de PD-L1 preferiblemente comprende una región variable de cadena pesada con una región CDR1, CDR2 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de una región de cadena pesada variable de una de la VH representada para MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5424; MF5561; MF5439; MF5553; MF5594; MF5426; MF5442 o MF5361 (Figura 3). Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 preferiblemente se seleccionan de la misma región VH.

Un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable que se puede unir a una parte extracelular de PD-L1 preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5424; MF5561; MF5439; MF5553; MF5594; MF5426; MF5442 o MF5361 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH del MF indicado. Las inserción(es),

supresión(es), sustitución(es) de aminoácidos o una combinación de las mismas, si las hay, preferiblemente no están en la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR.

- Un anticuerpo biespecífico preferiblemente comprende un dominio variable que se puede unir a una parte extracelular de CD137 que bloquea la unión de CD137 a ligando CD137 y un dominio variable que se puede unir a una parte extracelular de PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1. El dominio variable que une una parte extracelular de PD-L1 en este anticuerpo preferiblemente comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de una de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5424; MF5561; MF5439; MF5553; MF5594; MF5426; MF5442 o MF5361 (Figura 3). En una realización preferida, el dominio variable que une una parte extracelular de PD-L1 comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de una VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5424; MF5561; MF5439; MF5553; MF5594; MF5426; MF5442 o MF5361 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH del MF indicado.
- El dominio variable que une una parte extracelular de CD137 comprende una región VH de MF6754; MF6763; MF6785; o MF6797 (Figura 3). Una combinación particularmente preferida en este anticuerpo o parte funcional, derivado y/o análogo es la combinación de dominios variables que comprenden la secuencia indicada de MF6797 y MF7702; MF6763 y MF7702; MF6785 y MF7702; MF6797 y MF5553; MF6763 y MF5553; MF6785 y MF5553; MF6754 y MF5424; MF6763 y MF5561; MF6785 y MF5439; o MF6797 y MF5553.
- Un anticuerpo biespecífico como se describe en el presente documento preferiblemente comprende
- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6754; y
 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5594; MF5424; MF5426; MF5553; MF5442; MF5561; MF5439 o MF5361 (Figura 3).
- Un anticuerpo biespecífico preferiblemente comprende
- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF6754 y;
 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5594; MF5424; MF5426; MF5553; MF5442; MF5561; MF5439 o MF5361 (Figura 3) que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH del MF indicado.
- Un anticuerpo biespecífico como se describe en el presente documento preferiblemente comprende
- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6763; y
 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5594; MF5424; MF5426; MF5553; MF5442; MF5561; MF5439 o MF5361 (Figura 3).
- Un anticuerpo biespecífico preferiblemente comprende
- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF6763 y;
 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5594; MF5424; MF5426; MF5553; MF5442; MF5561; MF5439 o MF5361 (Figura 3) que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH del MF indicado.
- Un anticuerpo biespecífico como se describe en el presente documento preferiblemente comprende
- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6785; y

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5594; MF5424; MF5426; MF5553; MF5442; MF5561; MF5439 o MF5361 (Figura 3).

5 Un anticuerpo biespecífico preferiblemente comprende

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF6785 y;

10 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5594; MF5424; MF5426; MF5553; MF5442; o MF5561; MF5439 o MF5361 (Figura 3) que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH del MF indicado.

Un anticuerpo biespecífico como se describe en el presente documento preferiblemente comprende

15 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6797; y

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la CDR3 o la secuencia de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5594; MF5424; MF5426; MF5553; MF5442; MF5561; MF5439 o MF5361 (Figura 3).

20 Un anticuerpo biespecífico preferiblemente comprende

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF6797 y;

25 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5554; MF5576; MF5578; MF9375; MF9376; MF7702; MF5594; MF5424; MF5426; MF5553; MF5442; o MF5561; MF5439 o MF5361 (Figura 3) que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH del MF indicado.

30 Como se muestra en los Ejemplos, un anticuerpo con un dominio variable de unión a PD-L1 que se basa en MF5553 proporciona resultados de activación de células T particularmente buenos en combinación con diferentes dominios variables de unión a CD137, que incluyen MF6754, MF6763, MF6785 y MF6797.

Por lo tanto se proporciona además un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF6754; y

35 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF5553.

También se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6754; y

40 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF5553.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende la región VH con la secuencia de aminoácidos de MF6754 y;

45 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5553 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5553.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende la VH de MF6763; y

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF5553.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende la región VH de MF6763; y

- 5 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF5553.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF6763 y;

- 10 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5553 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5553.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 15 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF6785; y

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF5553.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 20 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6785; y

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF5553.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 25 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende la región VH de MF6785 y;

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5553 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5553.

- 30 En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF6797; y

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF5553.

- 35 En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6797; y

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF5553.

- 40 En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF6797 y;

- 45 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5553 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH de MF5553.

Se muestra además en los Ejemplos que un anticuerpo con un dominio variable de unión a PD-L1 que se basa en MF7702 proporciona resultados de activación de células T particularmente buenos en combinación con diferentes dominios variables de unión a CD137, que incluyen MF6763, MF6785 y MF6797.

Por lo tanto se proporciona además un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 5 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF6797; y
- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF7702.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 10 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende la región VH de la VH de MF6797; y
- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF7702.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende la región VH de MF6797 y;
- 15 - un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF7702 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH de MF7702.

Además se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 20 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF6763; y
- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF7702.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 25 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6763; y
- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF7702.

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 30 - un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF6763 y;
- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF7702 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH de MF7702.

35

Además se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF6785; y
- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la región CDR3 de la VH de MF7702.

40

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF6785; y
- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH de MF7702.

45

En una realización, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- un dominio variable de unión a CD137 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF6785 y;

- un dominio variable de unión a PD-L1 que comprende una región VH con la secuencia de aminoácidos de la VH de MF7702 que tiene a lo sumo 15, preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y que tiene preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 o 5 inserciones, supresiones, sustituciones de aminoácidos o una combinación de las mismas con respecto a la secuencia de aminoácidos de la VH de MF7702.

También se muestra en los Ejemplos que la unión del VH específico de CD137 de MF6797, que tiene buenas propiedades activadoras de células T, se asocia con la presencia de aminoácidos que comprenden Arg66, Gly70 y Phe72 de la secuencia de aminoácidos de CD137 como se representa en la Figura 42.

Por lo tanto la invención también proporciona un anticuerpo biespecífico aislado, sintético o recombinante que es capaz de unirse a CD137, en el que la unión de dicho anticuerpo a CD137 se asocia con la presencia de aminoácidos que comprenden Arg66, Gly70 y Phe72 de la secuencia de aminoácidos de CD137, como se representa en la Figura 42. El anticuerpo biespecífico se une a CD137 preferiblemente con un aminoácido que comprende Val71 de la secuencia de aminoácidos de CD137, como se representa en la Figura 42. La unión de dicho anticuerpo a CD137 se asocia preferiblemente también con un aminoácido que comprende Val71 de la secuencia de aminoácidos de CD137 como se representa en la Figura 42.

El término "Arg66" se refiere al residuo de arginina en la posición 66 de la secuencia de CD137 como se representa en la Figura 42. El término "Gly70" se refiere al residuo glicina en la posición 70 de la secuencia de CD137 como se representa en la Figura 42. El término "Val71" se refiere al residuo valina en la posición 71 de la secuencia de CD137 como se representa en la Figura 42. El término "Phe72" se refiere al residuo fenilalanina en la posición 72 de la secuencia de CD137 como se representa en la Figura 42.

La unión de un anticuerpo a CD137 se asocia con la presencia de los residuos de aminoácidos citados si, cuando uno cualquiera de estos residuos se sustituye por alanina, se reduce la unión del anticuerpo a la proteína CD137 resultante.

Algunas realizaciones proporcionan un anticuerpo biespecífico aislado, sintético o recombinante que es capaz de unirse a CD137, en el que dicho anticuerpo o parte funcional, derivado o análogo se une específicamente a los aminoácidos Arg66, Gly70 y Phe72 de la secuencia de aminoácidos de CD137 como se representa en la Figura 42. Dicho anticuerpo preferiblemente también se une específicamente al aminoácido Val71 de la secuencia de aminoácidos de CD137 como se representa en la Figura 42.

Algunas realizaciones preferidas proporcionan un anticuerpo biespecífico que es capaz de unirse a CD137 y a PD-L1 y que tiene un dominio variable de unión a CD137 basado en MF6797 y un dominio variable de unión a PD-L1 basado en MF7702. La unión de dicho anticuerpo biespecífico, que tiene propiedades activadoras de células T particularmente buenas, a CD137 y PD-L1 está asociada con aminoácidos que comprenden los residuos de aminoácidos de CD137 mencionados anteriormente.

Ahora que se han identificado los residuos de aminoácidos de CD137 mencionados anteriormente, es posible generar o seleccionar anticuerpos que se unan específicamente a estos residuos de aminoácidos. La generación y/o selección de moléculas de unión que se unen específicamente a ciertos residuos de aminoácidos se puede realizar utilizando métodos bien conocidos en la técnica, como por ejemplo al inmunizar un animal no humano transgénico capaz de generar anticuerpos con un fragmento de antígeno que contiene el dominio particular que comprende los residuos de aminoácidos diana. Alternativamente, al cribar una biblioteca de visualización de fagos de anticuerpos, en busca de fagos que se unan a los residuos de aminoácidos identificados.

La invención se explica con más detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para clarificar la invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Cadena ligera común utilizada en IgG monoespecíficas y biespecíficas.

Figura 1A: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera común. Figura 1B: Secuencia de ADN y traducción del dominio variable de la cadena ligera común (IGKV1-39/jk1). Figura 1C: Secuencia de ADN y traducción de la región constante de la cadena ligera común. Figura 1D: Traducción del dominio variable de la cadena ligera común IGKV1-39/jk5. Figura 1E: Región V IGKV1-39A

Figura 2. Cadenas pesadas de IgG para la generación de moléculas biespecíficas. Figura 2A: VH es un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos para un MF representado en la Figura 3. Figura 2B: región CH1. Figura 2C: región bisagra. Figura 2D: región CH2. Figura 2E: CH2 que contiene las sustituciones L235G

y G238R. Figura 2F: dominio CH3 que contiene las sustituciones L351K y T366K (KK). Figura 2G: Dominio CH3 que contiene las sustituciones L351D y L368E (DE).

Figura 3. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada. Figura 3A: Secuencias VH de clones específicos de CD137. Figura 3B: Secuencias VH de clones específicos de PD-L1. Figura 3C: Secuencias VH de clones específicos de OX40. Figura 3D: Secuencias VH de clones específicos de PD-L1.

La notación MF se refiere a un fab que contiene una región variable de cadena pesada como se representa y una cadena ligera común. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se indica en la figura 1A. Las secuencias subrayadas indican por secuencia de aminoácidos respectivamente la región CDR1, la CDR2 y la CDR3 de acuerdo con la numeración de Kabat.

Figura 4. Mapa del vector y características de pIRES-Neo3 (MV1363).

Figura 5. Mapa del vector y características de pVAX1.

Figura 6. Mapa del vector y características del vector fagémido MV1473 utilizado para generar bibliotecas de visualización de fagos 'inmunitarias'.

Figura 7. Mapa del vector y características del vector de expresión de IgG MV1452 o MV1453, que se utilizaron para la expresión de los brazos de Fab específicos de CD137, PD-1, PD-L1 y OX40 en la cadena pesada de la variante KK o la cadena pesada de la variante DE, respectivamente, para la generación de IgG biespecíficas.

Figura 8. Secuencia de aminoácidos del gen VH que es específico de la toxina tetánica cuando se combina con la cadena ligera común como MF1337, y que está presente en la cadena pesada de la variante DE que se utilizó para generar moléculas IgG biespecíficas PD-L1xTT. Las secuencias subrayadas indican por secuencia de aminoácidos respectivamente la región CDR1, la CDR2 y la CDR3.

Figura 9. Mapa del vector y características del vector de expresión de IgG MV1377, que se utilizó para la expresión del brazo Fab específico TT MF1337 en la cadena pesada de la variante DE para la generación de IgG biespecíficas.

Figura 10. Ensayo de bloqueo de PD-1/PD-L1.

Evaluación de la capacidad del panel de anticuerpos anti-PD-L1 para bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1 recubierto a una concentración de 10 µg/ml de IgG biespecífica. Los datos se normalizan con respecto a los datos obtenidos con el anticuerpo PD-L1 bivalente de referencia MPDL3280A a una concentración de 10 µg/ml (100 % de bloqueo). Se muestra un ejemplo representativo del panel PD-L1. La unión máxima (normalizada al 0 % de bloqueo) se estableció mediante incubación con un anticuerpo isotipo humano no específico de PD-1/PD-L1. Todos los dominios variables de PD-L1 que comprenden secuencias MF representadas en la Figura 3 y no representadas en el presente documento bloquean la interacción PD-1/PD-L1 > 70 %.

Figura 11. Activación de CD 137 en células Jurkat CD137-NFκBluc mediante anticuerpos CD137 bivalentes.

Figura 12. Activación de CD137 en células Jurkat CD137-NFκBluc Activación de CD137 en células Jurkat CD137-NFκBluc mediante anticuerpos CD137xPD-L1 en ausencia (izquierda) o presencia de un anticuerpo entrecruzado de IgG (derecha). Los números MF se refieren a los Fabs de CD137 presentes en los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1.

Figura 13. Activación de células T primarias por anticuerpos CD 137 bivalentes (parte superior) o anticuerpos monovalentes (parte inferior) en combinación con una rama Fab de PD-L1 (MF5594) según se mide por la liberación de IL-2.

PG6744: anticuerpo CD137 bivalente que contiene dos brazos MF6744 (también denominado 6744x6744).

PG6783: anticuerpo CD137 bivalente que contiene dos brazos MF6783 (también denotado como 6783x6783).

PG6860: anticuerpo CD137 bivalente que contiene dos brazos MF6860 (también denominado 6860x6860).

20H4.9: anticuerpo de referencia anti-CD137 basado en el documento WO 2005/035584.

Figura 14. Activación de CD137 en células Jurkat-CD137-luc Activación de CD137 en células Jurkat-CD137-luc en presencia de células CHO que sobreexpresan PD-L1 o células CHO de tipo silvestre. La activación de CD137 se midió mediante la expresión de luciferasa.

PG6744: anticuerpo CD137 bivalente (6744x6744)

PB14671: anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico (6744x5361)

PB14580: anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico (6744x5594)

PB14890: anticuerpo CD137xTT biespecífico (6744x1337)

PG6783: anticuerpo CD137 bivalente (6783x6783)

PB14681: anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico (6783x5361)

PB14590: anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico (6783x5594)

- 5 PB15855: anticuerpo CD137xTT biespecífico (6783x1337)

20H4.9: anticuerpo de referencia anti-CD137 basado en el documento WO 2005/035584

Figura 15. Activación de células T primarias por anticuerpos CD137 bivalentes, anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 o combinaciones de CD137xPD-L1 Oligoclónicos® en presencia de células CHO que sobreexpresan PD-L1 o células CHO de tipo silvestre. La activación se midió mediante la liberación de IL-2.

- 10 PG6744: anticuerpo CD137 bivalente (6744x6744)

PB14671: anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico (6744x5361)

PB14580: anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico (6744x5594)

PB14890: anticuerpo CD137xTT biespecífico (6744x1337)

20H4.9: anticuerpo de referencia anti-CD137 basado en el documento WO 2005/035584

- 15 MOR7480: anticuerpo de referencia anti-CD137 basado en el documento US 8,337,850

Figura 16. La estimulación SEB de la producción de IL-2 se mejora por el anticuerpo biespecífico anti-CD137xPD-L1 o por el Oligoclónicos® anti-CD137xPD-L1 en células sanguíneas de donantes sanos.

PB14580: anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico (6744x5594)

PB14671: anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico (6744x5361)

- 20 MPDL3280A: anticuerpo de referencia anti-PD-L1 basado en el documento WO 2010/077634

PB9469: anticuerpo PD-L1xTT biespecífico (5594x1337)

PB14890: anticuerpo CD137xTT biespecífico (6744x1337)

20H4.9: anticuerpo de referencia anti-CD137 basado en el documento WO 2005/035584

Ab. Ctrl: PG2708p213; anti RSV-G

- 25 Figura 17. La estimulación SEB de la producción de IL-2 en células sanguíneas de donantes sanos aumenta drásticamente con anticuerpos biespecíficos anti-CD137xPD-L1 en comparación con el anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 (que se basa en ipilimumab).

Figura 18. Activación de OX-40 en células Jurkat-OX-40 NFkB-luc en presencia de células CHO que sobreexpresan PD-L1 (panel izquierdo) o células CHO de tipo silvestre (panel derecho). La activación se determinó al medir la expresión de luciferasa. Brazo Fab de PD-L1 MF5561; brazo Fab de PD-1 MF6256 (secuencia mostrada en la Figura 43).

- 30

Figura 19. Cribado de anticuerpos CD137 X PD-L1 en ensayo de activación de células T (12 brazos Fab de CD137). Se estimularon células T de un único donante durante 72H a 37 °C con una titulación dependiente de la dosis del panel de anticuerpos indicado a continuación en presencia de células CHO que sobreexpresaban PD-L1 (paneles superiores) o células CHO de tipo silvestre (paneles inferiores). La activación de CD137 se midió mediante la liberación de IL-2 utilizando AlphaLISA, expresada en recuentos de IL-2. Anticuerpo de control positivo 20H4.9 (denominado en esta Figura como PG6619) y anticuerpo de control negativo anti-TT PG1337 (Ab Ctrl Neg.).

- 35

PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2
PB14143	MG6783	MG6783	PB14183	MG6763	MG6763	PB14145	MG6785	MG6785	PB14134	MG6737	MG6737
PB14590	MG6783	MG5594	PB14815	MG6763	MG5561	PB14821	MG6785	MG5561	PB14808	MG6737	MG5561
PB14820	MG6783	MG5561	PB15143	MG6763	MG5426	PB15149	MG6785	MG5426	PB15136	MG6737	MG5426
PB15190	MG6783	MG5424	PB17100	MG6763	MG5553	PB17103	MG6785	MG5553	PB17106	MG6737	MG5553
PB15148	MG6783	MG5426	PB14585	MG6763	MG5594	PB14591	MG6785	MG5594	PB14578	MG6737	MG5594
PB17095	MG6783	MG5442	PB15185	MG6763	MG5424	PB15191	MG6785	MG5424	PB15178	MG6737	MG5424
PB17097	MG6783	MG5553	PB17088	MG6763	MG5442	PB17091	MG6785	MG5442	PB17094	MG6737	MG5442
PB17109	MG6783	MG5439	PB17112	MG6763	MG5439	PB17115	MG6785	MG5439	PB17118	MG6737	MG5439
PB14203	MG6808	MG6808	PB14179	MG6754	MG6754	PB14162	MG6825	MG6825	PB14195	MG6797	MG6797
PB17050	MG6808	MG5561	PB14814	MG6754	MG5561	PB14829	MG6825	MG5561	PB14823	MG6797	MG5561
PB17074	MG6808	MG5426	PB15142	MG6754	MG5426	PB15157	MG6825	MG5426	PB15151	MG6797	MG5426
PB17098	MG6808	MG5553	PB17101	MG6754	MG5553	PB17104	MG6825	MG5553	PB17107	MG6797	MG5553
PB16841	MG6808	MG5594	PB14584	MG6754	MG5594	PB14605	MG6825	MG5594	PB14593	MG6797	MG5594
PB17062	MG6808	MG5424	PB15184	MG6754	MG5424	PB15199	MG6825	MG5424	PB15193	MG6797	MG5424
PB17086	MG6808	MG5442	PB17089	MG6754	MG5442	PB17092	MG6825	MG5442	PB17095	MG6797	MG5442
PB17110	MG6808	MG5439	PB17113	MG6754	MG5439	PB17116	MG6825	MG5439	PB17119	MG6797	MG5439
PB14149	MG6805	MG6805	PB14135	MG6744	MG6744	PB14138	MG6749	MG6749	PB14193	MG6788	MG6788
PB14826	MG6805	MG5561	PB14810	MG6744	MG5561	PB14813	MG6749	MG5561	PB17060	MG6788	MG5561
PB15154	MG6805	MG5426	PB15138p	MG6744	MG5426	PB15141	MG6749	MG5426	PB17084	MG6788	MG5426
PB17099	MG6805	MG5553	PB17102	MG6744	MG5553	PB17105	MG6749	MG5553	PB17108	MG6788	MG5553
PB14596	MG6805	MG5594	PB14580p	MG6744	MG5594	PB14583	MG6749	MG5594	PB16856	MG6788	MG5594
PB15196	MG6805	MG5424	PB15180	MG6744	MG5424	PB15183	MG6749	MG5424	PB17072	MG6788	MG5424
PB17087	MG6805	MG5442	PB17090	MG6744	MG5442	PB17093	MG6749	MG5442	PB17096	MG6788	MG5442
PB17111	MG6805	MG5439	PB17114	MG6744	MG5439	PB17117	MG6749	MG5439	PB17120	MG6788	MG5439

Figura 20. Cribado de anticuerpos CD137 X PD-L1 en ensayo SEB PBMC (12 brazos Fab de CD137). Los anticuerpos CD137xPD-L1 se probaron en el ensayo SEB PBMC en presencia de 2 µg/ml de SEB. La activación de CD137 se midió mediante la liberación de IL-2 utilizando AlphaLISA, expresada en recuentos de IL-2. Anticuerpo de control positivo; anticuerpo de control positivo a anti-CTLA-4 (basado en Ipilimumab, 10D1) y el anticuerpo de control negativo anti-RSV-G PG2708 (Ab Ctrl Neg.).

5

PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2
PB14143	MG6783	MG6783	PB14183	MG6763	MG6763	PB14145	MG6785	MG6785	PB14134	MG6737	MG6737	PB14134	MG6737	MG6737
PB14590	MG6783	MG5594	PB14815	MG6763	MG5561	PB14821	MG6785	MG5561	PB14808	MG6737	MG5561	PB14808	MG6737	MG5561
PB14820	MG6783	MG5561	PB15143	MG6763	MG5426	PB15149	MG6785	MG5426	PB15136	MG6737	MG5426	PB15136	MG6737	MG5426
PB15190	MG6783	MG5424	PB17100	MG6763	MG5553	PB17103	MG6785	MG5553	PB17106	MG6737	MG5553	PB17106	MG6737	MG5553
PB15148	MG6783	MG5426	PB14585	MG6763	MG5594	PB14591	MG6785	MG5594	PB14578	MG6737	MG5594	PB14578	MG6737	MG5594
PB17085	MG6783	MG5442	PB15185	MG6763	MG5424	PB15191	MG6785	MG5424	PB15178	MG6737	MG5424	PB15178	MG6737	MG5424
PB17097	MG6783	MG5553	PB17088	MG6763	MG5442	PB17091	MG6785	MG5442	PB17094	MG6737	MG5442	PB17094	MG6737	MG5442
PB17109	MG6783	MG5439	PB17112	MG6763	MG5439	PB17115	MG6785	MG5439	PB17118	MG6737	MG5439	PB17118	MG6737	MG5439
PB14203	MG6808	MG6808	PB14179	MG6754	MG6754	PB14162	MG6825	MG6825	PB14195	MG6797	MG6797	PB14195	MG6797	MG6797
PB17050	MG6808	MG5561	PB14814	MG6754	MG5561	PB14829p	MG6825	MG5561	PB14823	MG6797	MG5561	PB14823	MG6797	MG5561
PB17074	MG6808	MG5426	PB15142	MG6754	MG5426	PB15157	MG6825	MG5426	PB15151	MG6797	MG5426	PB15151	MG6797	MG5426
PB17098	MG6808	MG5553	PB17101	MG6754	MG5553	PB17104	MG6825	MG5553	PB17107	MG6797	MG5553	PB17107	MG6797	MG5553
PB16841	MG6808	MG5594	PB14584	MG6754	MG5594	PB14605	MG6825	MG5594	PB14583	MG6797	MG5594	PB14583	MG6797	MG5594
PB17062	MG6808	MG5424	PB15184	MG6754	MG5424	PB15199	MG6825	MG5424	PB15193	MG6797	MG5424	PB15193	MG6797	MG5424
PB17086	MG6808	MG5442	PB17089	MG6754	MG5442	PB17092	MG6825	MG5442	PB17095	MG6797	MG5442	PB17095	MG6797	MG5442
PB17110	MG6808	MG5439	PB17113	MG6754	MG5439	PB17116	MG6825	MG5439	PB17119	MG6797	MG5439	PB17119	MG6797	MG5439
PB14149	MG6805	MG6805	PB14135	MG6744	MG6744	PB14138	MG6749	MG6749	PB14193	MG6788	MG6788	PB14193	MG6788	MG6788
PB14826	MG6805	MG5561	PB14810	MG6744	MG5561	PB14813	MG6749	MG5561	PB17060	MG6788	MG5561	PB17060	MG6788	MG5561
PB15154	MG6805	MG5426	PB15138p	MG6744	MG5426	PB15141	MG6749	MG5426	PB17094	MG6788	MG5426	PB17094	MG6788	MG5426
PB17099	MG6805	MG5553	PB17102	MG6744	MG5553	PB17105	MG6749	MG5553	PB17108	MG6788	MG5553	PB17108	MG6788	MG5553
PB14596	MG6805	MG5594	PB14580p	MG6744	MG5594	PB14583	MG6749	MG5594	PB16856	MG6788	MG5594	PB16856	MG6788	MG5594
PB15196	MG6805	MG5424	PB15180	MG6744	MG5424	PB15183	MG6749	MG5424	PB17072	MG6788	MG5424	PB17072	MG6788	MG5424
PB17087	MG6805	MG5442	PB17090	MG6744	MG5442	PB17093	MG6749	MG5442	PB17096	MG6788	MG5442	PB17096	MG6788	MG5442
PB17111	MG6805	MG5439	PB17114	MG6744	MG5439	PB17117	MG6749	MG5439	PB17120	MG6788	MG5439	PB17120	MG6788	MG5439

Figura 21. Cribado de anticuerpos CD137 X PD-L1 en ensayo SEB PBMC (8 brazos Fab de CD137). Los anticuerpos CD137xPD-L1 se probaron en el ensayo SEB PBMC en presencia de 2 µg/ml de SEB. La activación de CD137 se midió por la liberación de IL-2 mediante AlphaLISA, expresada en recuentos de IL-2. Anticuerpo de control positivo; anticuerpo de control positivo anti-CTLA-4 (basado en Ipilimumab, 10D1) y el anticuerpo de control negativo anti-RSV-G PG2708 (Ab Ctrl Neg.).

5

PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2	PB	MF1	MF2
PB14203	MG6808	MG6808	PB17088	MG6763	MG5442	PB14591	MG6785	MG5594
PB17050	MG6808	MG5561	PB17112	MG6763	MG5439	PB15191	MG6785	MG5424
PB17074	MG6808	MG5426	PB14179	MG6754	MG6754	PB17091	MG6785	MG5442
PB17098	MG6808	MG5553	PB14814	MG6754	MG5561	PB17115	MG6785	MG5439
PB16841	MG6808	MG5594	PB15142	MG6754	MG5426	PB14162	MG6825	MG6825
PB17062	MG6808	MG5424	PB17101	MG6754	MG5553	PB14829	MG6825	MG5561
PB17086	MG6808	MG5442	PB14584	MG6754	MG5594	PB15157	MG6825	MG5426
PB17110	MG6808	MG5439	PB15184	MG6754	MG5424	PB17104	MG6825	MG5553
PB14149	MG6805	MG6805	PB17089	MG6754	MG5442	PB14605	MG6825	MG5594
PB14826	MG6805	MG5561	PB17113	MG6754	MG5439	PB15199	MG6825	MG5424
PB15154	MG6805	MG5426	PB14135	MG6744	MG6744	PB17092	MG6825	MG5442
PB17099	MG6805	MG5553	PB14810	MG6744	MG5561	PB17116	MG6825	MG5439
PB14596	MG6805	MG5594	PB15138	MG6744	MG5426	PB14195	MG6797	MG6797
PB15196	MG6805	MG5424	PB17102	MG6744	MG5553	PB14823	MG6797	MG5561
PB17087	MG6805	MG5442	PB14580	MG6744	MG5594	PB15151	MG6797	MG5426
PB17111	MG6805	MG5439	PB15180	MG6744	MG5424	PB17107	MG6797	MG5553
PB14183	MG6763	MG6763	PB17090	MG6744	MG5442	PB14593	MG6797	MG5594
PB14815	MG6763	MG5561	PB17114	MG6744	MG5439	PB15193	MG6797	MG5424
PB15143	MG6763	MG5426	PB14145	MG6785	MG6785	PB17095	MG6797	MG5442
PB17100	MG6763	MG5553	PB14821	MG6785	MG5561	PB17119	MG6797	MG5439
PB14585	MG6763	MG5594	PB15149	MG6785	MG5426			
PB15185	MG6763	MG5424	PB17103	MG6785	MG5553			

Figura 22. Los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos y sus anticuerpos bivalentes parentales anti-CD137 se unen a CD137 humano y de cynomolgus según se determina mediante citometría de flujo.

Figura 23. Los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos y sus anticuerpos anti-PD-L1 bivalentes parentales se unen a PD-L1 humana y de macaco rhesus según se determina por citometría de flujo.

10

Figura 24. Los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos y sus anticuerpos bivalentes parentales se unen a células T activadas según se determina mediante citometría de flujo.

Figura 25. Los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos y sus anticuerpos anti-PD-L1 bivalentes parentales bloquean la unión del ligando PD-L1 según se determina por ELISA.

Figura 26. Los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos y sus anticuerpos anti-PD-L1 bivalentes parentales bloquean la unión del ligando CD137 según se determina por citometría de flujo.

15

Figura 27. Los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos y sus anticuerpos bivalentes parentales bloquean la interacción entre PD-L1 y PD-1 en un ensayo indicador de bloqueo in vitro.

Figura 28 A. Transactivación de CD137 en células Jurkat-CD137-luc en presencia de células CHO que expresan diferentes sitios de unión a PD-L1 por célula en comparación con células CHO de tipo silvestre. La activación de CD137 se midió mediante la expresión de luciferasa.

20

Figura 28 B. Transactivación de CD137 en células Jurkat-CD137-luc en presencia de células tumorales humanas que expresan diferentes sitios de unión a PD-L1 por célula PD-L1. La activación de CD137 se midió mediante la expresión de luciferasa.

Figura 28 C. Transactivación de CD137 en células Jurkat-CD137-luc en presencia de células CHO-PD-L1, ES-2 o CHO de tipo silvestre. Las IgG se probaron por triplicado a 10 µg/ml. La activación de CD137 se midió mediante la expresión de luciferasa. A continuación se muestran los anticuerpos ensayados y su composición.

PB/PG	Brazo diana #1	MF	Brazo diana #2	MF
PG6763	CD137	6763	CD137	6763
PB17309	CD137	6763	PD-L1	7702
PB14879	CD137	6763	TT	1337
PG6785	CD137	6785	CD137	6785
PB17310	CD137	6785	PD-L1	7702
PB17200	CD137	6785	TT	1337
PG6797	CD137	6797	CD137	6797
PB17311	CD137	6797	PD-L1	7702
PB17207	CD137	6797	TT	1337
40H4.9	CD137	NA	CD137	NA
Ab Ctrl	TT	1337	TT	1337

Figura 29. Comparación de los anticuerpos CD137 X PD-L1 en el ensayo de activación de células T con controles de referencia únicos y de combinación. La activación de CD137 se midió como liberación de citocinas IL-2 y TNFα mediante análisis Luminex.

Figura 30. Actividad del anticuerpo CD137 X PD-L1 PB17311 en el ensayo de activación de células T en comparación con anticuerpos de control únicos y de combinación de referencia. La activación de CD137 se midió mediante liberación múltiple de citocinas y se midió mediante análisis Luminex (25plex).

Figura 31. Los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos aumentan sistemáticamente la liberación de IL-2 por las PBMC durante un ensayo de estimulación con SEB, independientemente del donante de PBMC o de la concentración de SEB. La activación de CD137 se midió como liberación de IL-2 y se midió mediante análisis Luminex.

Figura 32. Los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos son más potentes que un anticuerpo de referencia anti-CD137 o que una mezcla equimolar de anticuerpos de referencia anti-CD137 y anti-PD-L1 para mejorar la liberación de citocinas durante un ensayo de estimulación SEB. La activación de CD137 se midió como liberación de citocinas IL-2, IFNγ y TNFα mediante análisis Luminex.

Figura 33. PB17311 inhibe la supresión mediada por macrófagos M2 de PBMC estimuladas con anti-CD3/CD28, como lo demuestra la mejora de la liberación de IFNγ.

Figura 34. PB17311 mejora la expansión de células T tras el cebado de células T CD8+.

Figura 35. PB17311 mejora la diferenciación de células T vírgenes en células T efectoras y de memoria central tras el cebado. T_{N/SCM}: Memoria de células madre vírgenes; T_{CM}, Memoria central, T_{EM}, Memoria efectoras; T_E, células efectoras terminales.

Figura 36. Efecto de PB17311 sobre la expresión de CD107a y citocinas en la población total de células T. T_{EM}, memoria efectora; T_E, células efectoras terminales.

Figura 37. Efecto de PB17311 en la expresión de CD107a y citocinas en subconjuntos de células T.

Figura 38. Efecto de PB17311 en la proliferación de células T CD4 y CD8 que infiltran tumores derivadas de metástasis hepáticas en cáncer colorrectal (LM-CRC) y carcinoma hepático (HCC).

Figura 39. Identificación y visualización de residuos críticos en CD137 para PB17311. (A) Para cada clon mutado, el valor medio de unión se representa gráficamente en función del valor medio de expresión de CD137 del clon (círculos grises), medido por la unión del anticuerpo de control. La unión se expresa como porcentaje de la obtenida con el clon WT. Las líneas de puntos indican los umbrales utilizados para identificar los clones críticos (puntos negros). (B) La tabla enumera las reactividades de unión medias (y rangos) para todos los residuos críticos identificados. Los residuos críticos para la unión del Ab PB17311 (delineados en negro) fueron negativos para la unión del Ab PB17311 MAb (<20 % de unión a WT) pero positivos para el anticuerpo de control, 555955 (>70 % WT). (C) Los residuos críticos (contorno en recuadro) se visualizan en un modelo de CD137 basado en la estructura de OX40L murino unido a OX40 humano (PDB ID# 2HEY, Compaan et al., 2006). El residuo no validado, C133, se muestra en gris.

Figura 40. Efecto del anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 PB17311 sobre el volumen tumoral mediano en el día 19 en un modelo de ratón xenoinjertado. MTV, volumen tumoral mediano; TGI, inhibición del crecimiento tumoral; significación estadística en la prueba de Mann-Whitney indicada por * ($0.01 < P < 0.05$) y *** ($P < 0.001$) en comparación con el Grupo 1.

Figura 41. Interferencia de sCD137 con la activación de células T. Evaluación del efecto del CD137 soluble sobre la capacidad del anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico para activar células T primarias humanas.

Figura 42. Secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CD137.

Figura 43. Secuencia de aminoácidos de MF6256.

Ejemplos

Como se utiliza en el presente documento "MFXXXX" en el que X es independientemente un numeral 0-9, se refiere a un Fab que comprende un dominio variable en el que la VH tiene la secuencia de aminoácidos identificada por los 4 dígitos. A menos que se indique lo contrario, la región variable de cadena ligera del dominio variable tiene normalmente una secuencia de la Figura 1A, normalmente 1B. "MFXXXX VH" se refiere a la secuencia de aminoácidos de la VH identificada por los 4 dígitos. El MF comprende además una región constante de una cadena ligera y una región constante de una cadena pesada que normalmente interactúa con una región constante de una cadena ligera. PG se refiere a un anticuerpo monoespecífico que comprende cadenas pesadas y ligeras idénticas. PB se refiere a un anticuerpo biespecífico con dos cadenas pesadas diferentes. La región variable de las cadenas pesadas (VH) difiere y normalmente también la región CH3, en la que una de las cadenas pesadas tiene una mutación KK de su dominio CH3 y la otra tiene la mutación complementaria DE de su dominio CH3 (véase para referencia PCT/NL2013/050294 (publicado como WO2013/157954)).

Ejemplo 1

Generación de materiales para la selección y cribado

Cultivo de estirpes celulares

Las células ES-2 humanas (No. de cat. CRL-1978) se adquirieron de ATCC y se mantuvieron de forma rutinaria en McCoy's 5A (Gibco) suplementado con FBS al 10 % (Lonza). Las células Freestyle 293F (No. de cat. p/n51-0029) se obtuvieron de Invitrogen y se mantuvieron rutinariamente en medio 293 FreeStyle. Las estirpes celulares HEK293T (No. de cat. ATCC-CRL-11268) y CHO-K1 (No. de cat. DSMZ ACC110) se adquirieron de ATCC y se mantuvieron rutinariamente en DMEM/F12 (Gibco) suplementado con L-Glutamina (Gibco) y FBS (Lonza).

Generación de vectores de expresión de OX40, CD137 y PD-L1 para inmunización, y para generación de estirpes celulares estables

El ADNc de longitud completa de cada diana que incluye los sitios de restricción únicos para la clonación y la secuencia consenso de kozak para una traducción eficiente, se sintetizó u obtuvo mediante amplificación por PCR en una construcción de expresión disponible comercialmente, que contenía el ADNc diana, con cebadores específicos que introducían sitios de restricción únicos para la clonación y la secuencia consenso de kozak para una traducción eficiente. El ADNc de cada diana se clonó en una construcción de expresión eucariota tal como pIRES-Neo3 (Clontech; FIGURA 4) o pVAX1 (Thermo Fisher Scientific; FIGURA 5) mediante NheI/EcoRI, dando como resultado pIRES-Neo3_[TARGET_NAME] y pVAX1_[TARGET_NAME], respectivamente. Las secuencias de inserción se verificaron comparándolas con las secuencias de aminoácidos de Referencia del NCBI. Las construcciones pIRES-Neo3 se utilizaron para la generación de estirpes celulares estables. Las construcciones pVAX1 se utilizaron con fines de inmunización. Véase la TABLA 1 para una visión general de los nombres de las construcciones resultantes.

Secuencia de aminoácidos del inserto huCD137 de longitud completa (tanto en pIRES-Neo3 como en pVAX1) para la expresión en la superficie celular (Idéntico a GenBank: NP_001552.2):

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFS
SAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCK
QGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG
PSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKR
GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

De la cual:

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRS: péptido de señal.

- 5 LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFS SAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE
CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQK
RGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG PSPADLSPGASSVTPAPAREPGH SPQ: ECD de huCD137.

IISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSW: Región TM predicha.

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL: Cola intracelular.

- 10 Secuencia de aminoácidos de longitud completa del inserto CD137 de macaco (*Macaca fascicularis*) (tanto en pIRES-Neo3 como en pVAX1) para expresión en la superficie celular (Idéntico a GenBank: ABY47575.1):

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFS
SAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCLISGYHCLGAECMCEQDCK
QGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG
PSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQHIFFLALTSTVVLFLFLVLRFSVVKRS
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

De la cual:

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRS: péptido de señal.

- 15 LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFS SAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKE
CSSTSNAECDCLISGYHCLGAECMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKR
GICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDWCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHS PQ: ECD de maCD137.

IIFFLALTSTWLFLFLVLRFSW: Región TM predicha.

KRSRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL: Cola intracelular.

- 20 Secuencia de aminoácidos del inserto CD137 de rata de longitud completa (tanto en pIRES-Neo3 como en pVAX1) para la expresión en la superficie celular (Idéntico a GenBank: XP_008762505.1):

MGSSCYNMVTLLVVGTEEVRA TRNPCDSCEAGTFCSKYPPVCTSCPPSTYSS
TGGQPNC DICRVQCGYFRFKKPC STHNAECECEVEGFHCLGPKCTRCEKDCRP
GQELTEQGCKNCGLTGFNDQDGAGVCRPWTNCSLDGRSVLKNGTKEKDVVCG
PPVVSLS PSTTPSAVTTPERES GERPLQVLTFLALT LALLLFLIFILWFSVPKW
LRKKFPHIFKQPFKKAVRTAQEEDACSCRFPEEEEEGGGGSYEL

De la cual:

MGSSCYNMWTLLVGTEEVRA: péptido de señal.

- 25 TRNPCDSCEAGTFCSKYPPVCTSCPPSTYSSTGGQPNC DICRVQCGYFRFKKPC
STHNAECECEVEGFHCLGPKCTRCEKDCRP GQELTEQGCKNCGLTGFNDQDG
AGVCRPWTNCSLDGRSVLKNGTKEKDWCGPPWSLSPSTTPSAVTTPERESGE RPLQ: ECD de raCD137.

VLTLFLALT LALLLFLIFILWF: Región TM predicha.

SVPKWLRKKFPHIFKQPFKKAVRTAQEEDACSCRFPEEEEEGGGGSYEL: Cola intracelular.

Secuencia de aminoácidos del inserto huPD-L1 de longitud completa (tanto en pIRES-Neo3 como en pVAX1) para la expresión en la superficie celular (Idéntico a GenBank: AAI13735.1):

MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALI
VYWEMEDKNIIQFVHGEE DLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQ
DAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCAEGYP
KAEVIWTSSDHQVLSGKTTT TNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDP
EENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVK
KCGIQDTNSKKQSDTHLEET

De la cual:

- 5 MRIFAVFIFMTYWHLNA: péptido de señal.

FTVTVPKDLYVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEE
DLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRI
TVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTT
TNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHP
NER: ECD de huPD-L1.

THLVILGAILLCLGVALTFIF: Región TM predicha.

RLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET: Cola intracelular.

- 10 Secuencia de aminoácidos de longitud completa del inserto PD-L1 de macaco (macaca mulatta) (tanto en pIRES-Neo3 como en pVAX1) para expresión en la superficie celular (Idéntico a GenBank: ABO33161.1):

MRIFAVFIFTIYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTECRFPVEKQLGLTSLIV
YWEMEDKNIIQFVHGEE DLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQD
AGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCAEGYPK
AEVIWTSSDHQVLSGKTTT TNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLGPE
ENHTAELVIPELPLALPPNERTHLVILGAIFLLLGVALTFFIFYLKGRMMDMKKS
GIRVTNSKKQRDTQLEET

De la cual:

MRIFAVFIFTIYWHLNA: péptido de señal.

- 15 FTVTVPKDLYWEYGSNMTECRFPVEKQLGLTSLIVYWEMEDKNIIQFVHGEE
DLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKR
ITVKVNAPYNKINQRILWDPVTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT
TTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLGPEENHTAELVIPELPLALPP NER: ECD de maPD-L1.

THLVILGAIFLLLGVALTFFIF: Región TM predicha.

YLRKGRMMDMKSGIRVTNSKKQRDTQLEET: Cola intracelular.

- 20 Secuencia de aminoácidos de longitud completa del inserto OX40 humano (tanto en pIRES-Neo3 como en pVAX1) para la expresión en la superficie celular (Idéntico a GenBank: NP_003318.1):

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGM
VSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDT
VCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPA
SNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTAEAWPRTSQQGPSTRPVEVPGG
RAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQ
ADAHSTLAKI

De la cual:

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTG: péptido de señal.

LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPC
KPKTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFS
PGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPIT
VQPTAEAWPRTSQQGPSTRPVEVPGGRA: ECD.

- 5 VAAAILGLGLVLGLLGPLAILL: Región TM predicha.

ALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI: Cola intracelular.

Secuencia de aminoácidos de la longitud completa del inserto OX40 de rata (*Rattus norvegicus*) (tanto en pIRES-Neo3 como en pVAX1) para la expresión en la superficie celular (Idéntico a GenBank: NP_037181.1):

MYVWVQQPTAFLLLGLSLGVTVKLNCVKDTYPSGHKCCRECQPGHGMVSRCD
HTRDTVCHPCEPGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTEDTVCQC
RPGTQPRQDSSIIKLGVDVCVPCPPGHFSPGSNQACKPWTNCTLSGKQIRIIPASN
SLDTVCEDRSLLATLLWETQRTTFRPTTVPSTTVWPRTSQLPSTPTLVAPEGPAF
AVILGLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRSPNTPKPCWGNFSFRTPIQEEQTDTHF
TLAKI

- 10 De la cual:

MYVWVQQPTAFLLLGLSLG: péptido de señal.

VTVKLNCVKDTYPSGHKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDTVCHPCEPGFYNEAV
NYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTEDTVCQCRPGTQPRQDSSHKLGVDCVP
CPPGHFSPGSNQACKPWTNCTLSGKQIRHPASNSLDTVCEDRSLLATLLWETQ
RTTFRPTTVPSTTVWPRTSQLPSTPTLVAPEGP: ECD.

AFVILGLGLGLLAPLTVLLALYLL: Región TM predicha.

RKAWRSPNTPKPCWGNFSFRTPIQEEQTDTHFTLAKI: Cola intracelular.

- 15 Secuencia de aminoácidos de longitud completa del inserto OX40 de macaco (*Macaca fascicularis*) (tanto en pIRES-Neo3 como en pVAX1) para la expresión en la superficie celular (Idéntico a GenBank: XP_005545179.1):

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTTAKLHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNGM
VSRCNRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSAPCKACTWCNLRSGSERKQPCTATQDT
VCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPA
SNSSDAICEDRDPPPTQPQETQGPPARPTTVQPTTEAWPRTSQRPSRTPVEVPRG
PAVAAILGLGLALGLLGPLAMLLALLLLRRDQRLPPDAPKAPGGGSFRTPIQEE
QADAHISALAKI

De la cual:

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTTAK: péptido de señal.

LHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNGMVSRCNRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSAPK
CKACTWCNLRSGSERKQPCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHF
SPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPPTQPQETQGPPAR
TTVQPTTEAWPRTSQRPSRTPVEVPRGPA: ECD.

- 5 VAAAILGLGLALGLLGPLAMLL: Región TM predicha.

ALLLLRRDQRLPPDAPKAPGGGSFRTPIQEEQADAHISALAKI: Cola intracelular.

Generación de estirpes celulares estables que expresan CD137, OX40 o PD-L1

- Se utilizaron construcciones de expresión pIRES-Neo3_[TARGET_NAME] (TABLA 1) para generar clones Freestyle 293F o CHO-K1 que expresaran de forma estable las proteínas respectivas. Las construcciones se transfectaron transitoriamente en células CHO-K1 mediante transfección con lipofectamina, o utilizando transfección con PEI para células Freestyle 293F, y se cribaron mediante FACS utilizando anticuerpos que reaccionaban con las proteínas respectivas. Después de la confirmación la expresión, las células transfectadas transitoriamente se sembraron en dilución limitante y se cultivaron bajo la presión de selección correspondiente al constructo de expresión utilizado para obtener clones celulares estables. Después de 2-3 semanas de selección, los clones se cribaron por FACS. Los clones seleccionados se expandieron mediante pases seriados, se volvieron a analizar en FACS y se congelaron a -150 °C. Los nombres de los clones que expresan de forma estable las proteínas heterólogas son células CHO-K1_[TARGET_NAME] o células Freestyle 293F_[TARGET_NAME]. Véase en la TABLA 1 un resumen de las construcciones utilizadas para generar las estirpes celulares estables y su nombre resultante.

20 Ejemplo 2

Vacunación, selección y cribado

Ratones utilizados para inmunizaciones

- Para la generación de anticuerpos humanos que se unen a huCD137, huOX40 y huPD-L1, se inmunizaron ratones transgénicos para la cadena ligera humana VK1-39 (ratones de cadena ligera común, véase el documento WO2009/157771) y para un minilocus de cadena pesada humana (HC) (que comprende una selección de segmentos del gen V humano, todos los D humanos y todos los J humanos) con proteína recombinante o ADN que codifica las proteínas como se describe brevemente a continuación. Estos ratones se denominan ratones 'MeMo®'.

Inmunizaciones de proteína

- Los ratones 'MeMo®' se inmunizaron mediante inyecciones subcutáneas con proteína recombinante y adyuvante Gerbu MM (Gerbu Biotechnik c#3001). Para las inmunizaciones se utilizaron las proteínas recombinantes huPD-L1-His (SinoBiological; No. de cat. 10084-H08H), huOX40-Fc (R&D; No. de cat. 3388-OX) y huOX40-His (SinoBiological; No. de cat. 10481-H08H). No se realizaron inmunizaciones con proteínas para la generación del panel de anticuerpos CD137. Los ratones se inmunizaron con 40 µg de proteína recombinante en PBS mezclada con 40 µl de adyuvante en un volumen total de 100 µl. Posteriormente, los ratones se reforzaron en los días 14 y 28 con 20 µg de proteína recombinante en PBS junto con 20 µl de adyuvante en un volumen total de 50 µl. El suero de los ratones se recolectó el día 35 para determinar los títulos séricos. Los ratones con títulos séricos bajos recibieron ciclos adicionales de inmunizaciones de refuerzo y análisis de suero. Cada ciclo consistió en dos inmunizaciones semanales utilizando 20 µg de proteína recombinante en 50 µl de PBS, seguidas una semana más tarde de la recolección de suero para el análisis de

títulos. Los ratones que mostraron títulos séricos elevados frente a la diana humana y macaco recibieron una inmunización de refuerzo final consistente en inyecciones diarias con 20 µg de proteína recombinante en 50 µl de PBS durante tres días consecutivos. Un día después de la última inyección se recolectó tejido linfóide de ratón.

5 Inmunizaciones de ADN

Los ratones MeMo® se inmunizaron mediante tatuaje de ADN utilizando un dispositivo de micropigmentación. Las inmunizaciones por tatuaje de ADN se realizaron con 20 µg de ADN plasmídico que codifica el antígeno diana (pVAX1_[TARGET_NAME], TABLA 1). Los ratones se inmunizaron con ADN que codificaba únicamente la diana humana (PD-L1) o mediante inmunizaciones alternas con ADN que codificaba la diana humana y de rata (CD137, OX40) para obtener anticuerpos de reactividad cruzada entre especies. Para las inmunizaciones con PD-L1, se eliminaron las células Treg cuatro días antes del inicio de la inmunización mediante inyección a los ratones con 0.5 mg de anticuerpo anti-CD25 PC61.5 (Bioceros) para romper la tolerancia. Los ratones se inmunizaron en los días 0, 3, 6, 14, 17, 28 y 31. El suero de los ratones se recolectó en el día 1. El suero de los ratones se recolectó el día 35 para determinar los títulos séricos. Los ratones con baja reactividad sérica frente a la diana humana y/o macaco recibieron ciclos adicionales de inmunizaciones de refuerzo con antígeno de ADN humano, de rata o macaco y análisis de suero. Cada ciclo consistió en dos inmunizaciones semanales con ADN seguidas, una semana más tarde, de la recolección de suero para el análisis de títulos. Los ratones que mostraron una fuerte reactividad sérica contra las células que expresaban la diana humana y de macaco recibieron una última inmunización de refuerzo seguida, al cabo de 3 días, de la recolección de tejido linfóide.

20 Combinación de inmunizaciones de proteínas y ADN (sólo OX40)

Los ratones se inmunizaron con huOX40-His recombinante (SinoBiological; No. de cat. 10481-H08H) y se reforzaron al alternar inmunizaciones de ADN (pVAX1_raOX40) y proteína (huOX40-His) para obtener anticuerpos de reactividad cruzada entre especies. Por lo tanto, los ratones se inmunizaron con 40 µg de proteína recombinante en PBS mezclada con 40 µl de adyuvante en un volumen total de 100 µl. Posteriormente, los ratones se reforzaron en los días 14 y 17 mediante tatuaje de ADN con 20 µg de pVAX1_raOX40, seguido en el día 28 por inmunización de proteína con 20 µg de proteína huOX40-His en PBS junto con 20 µl de adyuvante en un volumen total de 50 µl. El suero de los ratones se recolectó el día 35 para determinar los títulos séricos. Los ratones con títulos bajos en suero humano y/o de macaco recibieron ciclos adicionales de inmunizaciones de refuerzo y análisis de suero. Cada ciclo consistió en dos inmunizaciones semanales de proteína o ADN con 20 µg de huOX40-His, pVAX1_raOX40 o pVAX1_maOX40, seguidas una semana después de la recolección de suero para el análisis de títulos. Los ratones que mostraron títulos séricos elevados frente a la diana humana y macaco recibieron una inmunización de refuerzo final consistente en inyecciones diarias con 20 µg de proteína recombinante en 50 µl de PBS durante tres días consecutivos. Un día después de la última inyección se recolectó tejido linfóide de ratón.

35 Determinación de los títulos séricos

Los títulos séricos se determinaron mediante análisis FACS utilizando estirpes celulares que expresaban los antígenos diana humanos y de macaco (Tabla 1).

Generación de bibliotecas de fagos Fab sintéticos

Se construyeron bibliotecas sintéticas basadas en un repertorio de genes VH humanos de la línea germinal que se seleccionaron por su uso frecuente en repertorios naturales y su diversidad de secuencias canónicas. Se agregaron regiones HCDR3 sintéticas a estos genes VH utilizando PCR. Para ello, se utilizaron cebadores directos que se acoplan al marco 1 de los genes VH e incluyen un sitio de restricción SfiI para la clonación. Los cebadores inversos incluían secuencias que se acoplan al marco 3 de los genes VH, seguidas de secuencias aleatorias para codificar la diversidad HCDR3 y una secuencia codificadora del marco 4 que también contiene un sitio de restricción BstEII y XhoI para la clonación. Las regiones CDR3 sintéticas eran completamente aleatorias o codificaban una diversidad más restringida basada en la frecuencia de uso de residuos de aminoácidos en determinadas posiciones dentro de la HCDR3. Los productos PCR que codificaban los genes VH se clonaron en vectores de visualización de fagos en fusión con la proteína del gen 3 del fago M13 utilizando las enzimas de restricción mencionadas y conteniendo también un gen común codificador de la cadena ligera. La ligación y transformación a gran escala de TG1 de E. coli dio lugar a grandes bibliotecas de fragmentos Fab sintéticos visualizados en fagos que se utilizaron para el paneo en antígenos o células para identificar fragmentos Fab específicos de antígeno.

Generación de bibliotecas Fab de fagos 'inmunitarios' mediante RT-PCR a partir de tejidos de ratones inmunizados

55 Se extirparon el bazo y los ganglios linfáticos de drenaje de los ratones en los que se observó una respuesta humoral significativa contra las proteínas diana respectivas.

Se generaron suspensiones de células individuales tanto del bazo como de los ganglios linfáticos inguinales y posteriormente estos tejidos se lisaron en reactivo Trizol LS (Thermo Scientific c#10296028) y se almacenaron a -80 °C hasta uso.

A partir de ratones inmunizados con éxito, se utilizaron los ganglios linfáticos inguinales para la construcción de repertorios de anticuerpos fágicos 'inmunitarios'. Se extrajo ARN de las suspensiones de células individuales del tejido linfóide. Se utilizó 1 µg de ARN total en una reacción de RT utilizando un cebador específico de IgG-CH1. El ADNc resultante se utilizó entonces para amplificar el grupo policlonal de ADNc codificante de VH utilizando cebadores específicos de VH adaptados internamente esencialmente como se describe en Marks et al. (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97). A continuación, el producto PCR resultante se clonó en un vector fagémido (FIGURA 6) para la visualización de fragmentos Fab en fagos, como se describe en de Haard et al. (J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30) con la excepción de que la cadena ligera (Figura 1A y 1B) era la misma para cada anticuerpo y estaba codificada por el vector. Después de la ligación, los fagémidos se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* TG1 y las bacterias transformadas se sembraron en placas LB-agar que contenían ampicilina y glucosa. Todas las bibliotecas de fagos contenían $>4 \times 10^5$ transformantes y tenían una frecuencia de inserción $> 90 \%$. Las bacterias se cosecharon después de una noche de crecimiento y se utilizaron para preparar los fagos de acuerdo con los protocolos establecidos (de Haard et al., J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30).

Selección de fagos portadores de fragmentos Fab que se unen específicamente a la proteína diana humana a partir de bibliotecas Fab de fagos sintéticos e 'inmunitarios' utilizando proteínas recombinantes.

Las bibliotecas Fab de fagos que se generaron se utilizaron para seleccionar Fabs específicos de diana utilizando visualización de fagos en proteínas recombinantes recubiertas directamente. Para PD-L1, se utilizaron huPD-L1-His (Sinobiological; No. de cat. 10084-H08H), huPD-L1-Fc (R&D; No. de cat. 156-B7), y maPD-L1-His (Sinobiological; No. de cat. 90251-C08H). Para CD137, se utilizaron huCD137-Fc (R&D; No. de cat. 838-4B), raCD137-Fc (R&D; No. de cat. 7968-4B), moCD137-Fc (R&D; No. de cat. 937-4B), huCD137-His (SinoBiological; No. de cat. 10041-H08H) y huCD137-Fc (Enzo; No. de cat. ALX-522-031-C050), y para OX40, huOX40-Fc (R&D; No. de cat. 3388-OX) y huOX40-His (Sinobiological; No. de cat. 10481-H08H).

Para las selecciones con proteína recombinante, las proteínas se recubrieron en los pocillos de una placa MAXISORP™ ELISA. Las placas MAXISORP™ ELISA se bloquearon con leche desnatada en polvo al 4 % (Marvel) en PBS. Las bibliotecas de fagos Fab también se bloquearon con Marvel al 4 % y, cuando se utilizó proteína recombinante etiquetada con Fc, también con un exceso de IgG humana para agotar las uniones de la región Fc antes de la adición de la biblioteca de fagos al antígeno recubierto.

La incubación de la biblioteca de fagos con la proteína recubierta se realizó durante 1.5 horas a temperatura ambiente bajo condiciones de agitación. A continuación, las placas o los tubos se lavaron quince veces con Tween-20 al 0.05 % en PBS, seguido de cinco lavados con PBS. Los fagos unidos se eluyeron durante 20 minutos utilizando tripsina, después de lo cual la tripsina se neutralizó con el inhibidor de tripsina AEBSF (Sigma).

Los eluidos se agregaron a TG-1 de *E. coli* y se incubaron a 37 °C para la infección por fagos. Posteriormente, las bacterias infectadas se sembraron en placas de agar que contenían Ampicilina y glucosa, y se incubaron a 37 °C durante la noche. Se cribaron clones individuales de los resultados de la selección para determinar la unión a la diana mediante ELISA o FACS, dependiendo de la diana.

Para las selecciones con bibliotecas Fab de fagos sintéticos, se realizó una segunda ronda de selección después de rescatar el resultado de la primera ronda de selección utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente para la primera ronda de selección.

Selección de fagos portadores de fragmentos Fab que se unen específicamente a la diana humana a partir de bibliotecas Fab de fagos 'inmunitarios' utilizando células que expresan de forma estable la proteína diana

Las bibliotecas Fab de fagos que se generaron a partir de ratones inmunizados contra la diana se seleccionaron mediante visualización de fagos en células que expresaban la diana respectiva. Las estirpes celulares estables que expresan CD137, OX40 o PD-L1 (Tabla 1) se utilizaron para selecciones de 1ª ronda. Las células se bloquearon con FBS al 10 % en PBS. Después del bloqueo, los fagos rescatados se incubaron con las células bloqueadas. Las células más los fagos se incubaron durante 1 h a 4 °C. Se realizó lavado de las células (5 veces) utilizando 1 ml de FBS al 10 % en PBS. Los fagos unidos se eluyeron con tripsina durante 20 minutos, después de lo cual la tripsina se neutralizó con el inhibidor de tripsina AEBSF (Sigma). El eluido se agregó a TG-1 de *E. coli* y se incubó a 37 °C para la infección por fagos. Posteriormente, las bacterias infectadas por los fagos se sembraron en placas de agar que contenían ampicilina y glucosa, y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Para PD-L1, se realizaron selecciones de segunda ronda con células ES-2 que expresan endógenamente huPD-L1 con el mismo protocolo que se utilizó para la selección de 1ª ronda. Después de la selección, se cribaron clones individuales para la unión a diana en FACS.

Cribado de clones Fab específicos de la diana en ELISA

De los clones individuales, se prepararon Fab solubles o fagos (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97; J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30). Las muestras de Fab o fagos solubles obtenidas se diluyeron (1:5 o 1:10, respectivamente) en leche desnatada en polvo al 4 % (Marvel) en PBS (tampón de bloqueo) y se probó para unión en ELISA a pocillos recubiertos con el mismo antígeno que se utilizó para la selección, o con huCD137-Fc (R&D; No. de cat. 838-4B) para todos los resultados de selección realizados con raCD137-Fc (R&D; No. de cat. 7968-4B) o moCD137-Fc (R&D; No. de cat. 937-4B).

Los Fabs unidos se detectaron por tinción con un anticuerpo anti-myc (Roche; No. de cat. 11667203001) diluido 1:1000 en tampón de bloqueo, seguido de un anticuerpo de IgG anti-ratón conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch; No. de cat. 715-035-150) diluido 1:5000 en tampón de bloqueo. Los fagos unidos se detectaron mediante tinción con un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado con HRP (GE healthcare; No. de cat. 27-9421-01) diluido a 1:5000 en tampón de bloqueo.

Después de cada tinción con anticuerpos, los pocillos se lavaron con PBS-T (PBS-Tween 20 al 0.05 % v/v). El anticuerpo secundario unido se visualizó mediante tinción con TMB/H₂O₂ y la tinción se cuantificó mediante la medición de la DO_{450nm}. Se consideró que los clones se unían a la diana cuando la DO_{450nm} era al menos tres veces superior a la señal de fondo obtenida con un Fab de control negativo.

Se secuenciaron los ADNc que codifican VH de todos los clones específicos de la diana. A continuación, se analizó en FACS una selección de clones únicos basada en la identidad de secuencia y el análisis de agrupamientos sobre la unión a la diana expresada en células como se describe a continuación para los clones obtenidos a partir de los resultados de la selección de células.

Cribado de clones Fab específicos de diana en FACS

De clones únicos, seleccionados en células que expresan la diana respectiva, se prepararon Fab solubles o fagos como se describe (J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97; J Biol Chem. 1999 Jun 25;274(26):18218-30). Se probó la unión de muestras Fab en FACS a células que expresaban la diana humana y macaco (Tabla 1) mediante incubación con una mezcla de muestra Fab diluida 1:5 con anticuerpo anti-myc diluido 1:1000 (Gentaur; No. de cat. 04-CMYC-9E10) en tampón FACS (HI-FBS al 0.5 % en PBS). Los complejos Fab/anti-myc unidos se detectaron mediante incubación con un anticuerpo de IgG antiratón de cabra conjugado con APC (BD Bioscience; No. de cat. 550826) diluido 1:500 en tampón FACS.

Las muestras de fagos se probaron para la unión en FACS al diluir las muestras de fagos 1:3 en tampón de bloqueo e incubación con células que expresan la diana durante 1 hora. Los fagos unidos se detectaron mediante tinción con un anticuerpo anti-M13 biotinilado (Fitzgerald, No. de cat. 61R-M101ABTB62-FEZ, 1:125 en tampón FACS, 30 minutos en hielo) y estreptavidina marcada con PE (Invitrogen, No. de cat. SA1004-4; 1:400 en tampón FACS durante 15 minutos en hielo). Después de cada incubación con anticuerpos, los pocillos se lavaron tres veces con tampón FACS. Las células teñidas se analizaron utilizando un instrumento FACS Accuri C6 (Becton and Dickinson). Los clones se consideraron positivos cuando la intensidad media de fluorescencia era al menos tres veces superior a la señal de fondo obtenida con un control negativo Fab.

Resultados

Las secuencias VH de 24 clones específicos de CD137, 14 clones específicos de PD-L1 y 50 clones específicos de OX40 que se obtuvieron mediante los métodos anteriormente mencionados se representan en la Figura 3.

Ejemplo 3

Caracterización de clones Fab específicos de huCD137, huOX40 y huPD-L1 en formato IgG

Reclonación de Fab específicos de CD137, OX40 y PD-L1 humanos en formato IgG

Una selección de clones únicos, basada en la secuencia CDR3 y las diferencias de la línea germinal VH, que unían la proteína diana humana y de macaco expresada en células, se volvió a clonar en un plásmido de expresión de IgG tal como MV1452 (Figura 7), que contenía la cadena ligera común (Figura 1), utilizando la digestión Sfi1-BstEII y la ligación del grupo de ADNc digeridos de acuerdo con técnicas biológicas moleculares estandarizadas.

Expresión de IgG biespecífica que contiene un Fab humano específico de CD137, OX40 o PD-L1 y un Fab específico de toxina tetánica.

Los anticuerpos biespecíficos se generaron mediante la cotransfección transitoria de dos plásmidos que codifican IgG con diferentes dominios VH, utilizando una tecnología de ingeniería de CH3 patentada para garantizar la heterodimerización eficiente y la formación de anticuerpos biespecíficos. La cadena ligera común presente en ambos plásmidos que contienen la cadena pesada también se cotransfecta en la misma célula. En nuestras solicitudes en trámite (por ejemplo documentos WO2013/157954 y WO2013/157953) hemos

divulgado métodos y medios para producir anticuerpos biespecíficos de partir de una única célula, por los que se proporcionan medios que favorecen la formación de anticuerpos biespecíficos frente a la formación de anticuerpos mono-específicos. Estos métodos también se pueden emplear favorablemente en la presente invención. Específicamente, las mutaciones preferidas para producir esencialmente sólo moléculas de IgG biespecíficas de longitud completa son sustituciones de aminoácidos en las posiciones 351 y 366, por ejemplo L351K y T366K (numeración de acuerdo con la numeración EU) en el primer dominio CH3 (la cadena pesada de 'variante KK') y sustituciones de aminoácidos en las posiciones 351 y 368, por ejemplo L351D y L368E en el segundo dominio CH3 (la cadena pesada de 'variante DE'), o viceversa. Se demostró previamente en nuestras solicitudes en trámite que la cadena pesada de la variante DE cargada negativamente y la cadena pesada de la variante KK cargada positivamente se emparejan preferencialmente para formar heterodímeros (las llamadas moléculas biespecíficas "DEKK"). La homodimerización de cadenas pesadas de variante DE (homodímeros DE-DE) o cadenas pesadas de variante KK (homodímeros KK-KK) apenas se produce debido a la fuerte repulsión entre los residuos cargados en la interfaz CH3-CH3 entre cadenas pesadas idénticas.

Los genes VH que codifican los anticuerpos que unen CD137, OX40 y PD-L1 humanos descritos anteriormente se clonaron en un vector de expresión IgG tal como MV1452 que codifica el dominio CH3 cargado positivamente. Un anticuerpo dirigido contra la toxina tetánica (TT) (Figura 8) se clonó en el vector de expresión IgG MV1377 (Figura 9) que codifica el dominio CH3 cargado negativamente. Para la expresión del panel de anticuerpos CD137 en formato IgG, también se clonó todo el panel en el vector del dominio CH3 cargado negativamente para poder producir IgG bivalentes CD137xCD137 mono-específicas.

Las células 293F Freestyle adaptadas al crecimiento en suspensión se cultivaron en matraces T125 en una meseta agitadora hasta una densidad de 3.0×10^6 células/ml. Las células se sembraron a una densidad de $0.3-0.5 \times 10^6$ células viables/ml en cada pocillo de una placa de 24 pocillos de profundidad (formato de 24 pocillos). Las células se transfectaron transitoriamente con una mezcla de dos plásmidos que codifican diferentes anticuerpos, clonados en el sistema de vectores propio. Siete días después de la transfección, se cosechó el sobrenadante celular y se filtró a través de un filtro de $0.22 \mu\text{M}$ (Sartorius). El sobrenadante estéril se almacenó a 4°C hasta la purificación de los anticuerpos.

Purificación de IgG (biespecífica)

La purificación de IgG se realizó a pequeña escala ($< 500 \text{ pg}$), utilizando cromatografía de afinidad con proteína A. La purificación se realizó bajo condiciones estériles en placas de filtro de 24 pocillos utilizando filtración. En primer lugar, se ajustó el pH del medio a pH 8.0 y, posteriormente, los sobrenadantes que contenían IgG se incubaron con perlas de proteína A Sepharose CL-4B (50 % v/v) (Pierce) durante 2 h a 25°C en una plataforma de agitación a 600 rpm. A continuación, se cosecharon las microesferas por filtración. Las perlas se lavaron dos veces con PBS pH 7.4. A continuación, la IgG unida se eluyó a pH 3.0 con tampón citrato 0.1 M y el eluido se neutralizó inmediatamente con Tris pH 8.0. El intercambio de tampón se realizó mediante centrifugación. El intercambio de tampones se realizó mediante centrifugación utilizando multiplacas multipantalla Ultracel 10 (Millipore). Finalmente, las muestras se cosecharon en PBS pH 7.4. La concentración de IgG se midió utilizando Octet. Las muestras de proteínas se almacenaron a 4°C .

Cuantificación de IgG utilizando Octet

Para determinar la cantidad de IgG purificada, se determinó la concentración de anticuerpo mediante el análisis Octet utilizando biosensores de proteína-A (Forte-Bio, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor) utilizando IgG humana total (Sigma Aldrich, No. de cat. I4506) como estándar.

Análisis de especificidad de IgG bivalente huCD137xCD137 e IgG biespecífica huOX40xTT y huPD-L1xTT

La IgG bivalente huCD137xCD137 y las IgG biespecíficas huOX40xTT y huPD-L1xTT se probaron para unión en FACS a las estirpes celulares estables que expresan los ortólogos humanos y de macacos relevantes (Tabla 1) y las células wt. Por lo tanto, se cosecharon las células y se diluyeron a 10^6 células/ml en tampón FACS (PBS/BSA al 0.5 %/EDTA 0.5 mM). Se agregaron $1-2 \times 10^5$ células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U. Las células se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g a 4°C . El sobrenadante se desechó al invertir la(s) placa(s). Se agregaron 50 μl de cada muestra de IgG a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron durante 1 h en hielo. Las células se centrifugaron una vez, se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces con 150 μl de tampón FACS. Se agregaron 50 μl de IgG antihumana de cabra PE diluida 1:400 (Invitrogen) y se incubaron durante 30 minutos en hielo en la oscuridad. Después de agregar el tampón FACS, las células se centrifugaron una vez, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con tampón FACS. Las células se analizaron en un citómetro de Flujo FACSCanto (Becton and Dickinson) en un entorno HTS. La unión de los anticuerpos a las células se evaluó al medir la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la población celular teñida. Se consideró que los anticuerpos se unían a su diana cuando la MFI era al menos cinco veces superior a la de la misma población celular teñida con un anticuerpo (control negativo) de no unión (dirigido al toxoide tetánico).

Combinación de brazos Fab específicos de huCD137 presentes en IgG bivalente CD137xCD137 sobre la capacidad de bloquear la interacción de CD137 con CD137L

Se probaron clones de unión a huCD 137 en formato IgG bivalente para comprobar su capacidad de bloquear la interacción de CD137 con CD137L. Por lo tanto, se recubrieron pocillos de una placa Maxisorp de 96 pocillos con CD137-Fc recombinante (R&D; No. de cat. 838-4B) a 1.25 µg/ml en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron dos veces con PBST (Tween20 al 0.05 % v/v en PBS), y posteriormente se bloquearon con BSA al 2 % en PBS (tampón de bloqueo) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con 0.25 µg/ml de biotina CD137L-muCD8 (Ancell; No. de cat. 503-030) diluida en tampón de bloqueo en presencia o ausencia de 20 µg/ml de IgG. A continuación, se repitieron las etapas de lavado y se incubaron los pocillos con estreptavidina conjugada con HRP (Becton Dickinson; No. de cat. 554066) diluida 1:2000 en tampón de bloque durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la detección de la estreptavidina unida, los pocillos se lavaron tres veces con PBST y se incubaron con los componentes A y B del sustrato TMB (relación 1:1) (Becton Dickinson; No. de cat. 51-2606KC y 51-2607KC, respectivamente). La reacción se detuvo después de 10 minutos con H₂SO₄ 1M y se midió la OD_{450nm} utilizando un lector de placas ELISA. En base a los resultados, los clones se combinaron en 4 grupos diferentes: se consideró que los "clones bloqueantes" bloqueaban completamente la interacción de CD137 con CD137L cuando la señal ELISA se reducía más del 70 % a una concentración de IgG (CD137xCD137) de 20 µg/ml, en comparación con un control en el que se agregaba un anticuerpo de competencia específico de TT (0 % de bloqueo); los "clones parcialmente bloqueantes" redujeron la señal entre un 25-70 %; los "clones no bloqueantes" mostraron una señal ELISA que se reducía hasta un 25 %, o mejoraba hasta un 25 %; los "clones mejoradores" mostraron un aumento de la señal ELISA superior al 25 %. Los resultados obtenidos con una selección representativa del panel de anticuerpos CD137 probados como moléculas biespecíficas CD137xCD137 se indican en la Tabla 2.

Combinación de brazos Fab específicos de huCD137 presentes en IgG bivalente CD137xCD137 en la especificidad de dominio

Los clones de unión huCD137 mencionados anteriormente en formato IgG bivalente también se probaron para la especificidad de dominio en FACS en células HEK293T que se transfectaron transitoriamente con ocho construcciones de expresión híbridas CD137 de ratón/humano pIRES-Neo3 diferentes, una construcción de expresión pIRES-Neo3 de CD137 de ratón FL (véanse las secuencias de inserción de aminoácidos más abajo) o la construcción de expresión pIRES-Neo3_huCD137 utilizada para la generación de células Freestyle 293F estables que expresan huCD137 (Tabla 1). Se utilizó el mismo protocolo FACS como se describió anteriormente durante el análisis de especificidad del panel de anticuerpos. Para la generación de las construcciones híbridas, el dominio extracelular de CD137 humano y de ratón se dividió en 5 dominios; 4 dominios ricos en cisteína basados en las secuencias de referencia Uniprot Q07011 (huCD137) y P20334 (moCD137) y 1 dominio bisagra desde el extremo del dominio rico en cisteína 4 hasta el dominio transmembrana. Las siguientes secuencias de aminoácidos insertadas se clonaron en pIRES-Neo3 (Figura 4) mediante NheI/EcoRI; el texto en negrita es el péptido de señal. El texto subrayado es la secuencia idéntica a la CD137 humana. El texto en cursiva representa las secuencias de los dominios transmembrana e intracelular.

Secuencia de aminoácidos de longitud completa de CD137 de ratón.

MGNNCYNVVVIVLLL VGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFORKYNPVCKSOPPSTF
SSIGGGQPNONICRVCAGYFRFKKFCSSSTHNAECECEIEGFHICLGPQCTRCEKDCR
PGQELTKQGCKTCSLGTTFNDQNGTGVC RPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVC
GPPVVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHS LQVLTFLALTSALLALIFITLLFSVLKWIR
KKFPPIIFKQPFKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL

Inserto quimérico A de la secuencia de aminoácidos mo/huCD137 (dominio humano rico en cisteína 1; secuencia de ratón del dominio rico en cisteína 2 directo).

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTECDNNENQICSSCPPSTF
SSIGGGQPNONICRVCAGYFRFKKFCSSSTHNAECECEIEGFHICLGPQCTRCEKDCR
PGQELTKQGCKTCSLGTTFNDQNGTGVC RPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVC
GPPVVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHS LQVLTFLALTSALLALIFITLLFSVLKWIR
KKFPPIIFKQPFKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL

Inserto quimérico B de la secuencia de aminoácidos mo/huCD137 (dominio humano rico en cisteína 1 y 2; secuencia de ratón del dominio rico en cisteína 3 directo).

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPTNSF
SSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKECSSTSNAECECEIEGFHCLGPQCTRCEKDCR
PGQELTKQGCKTCSLCTFNDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTCTTEKDVVC
GPPVVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSIQVLTLFLALTSALLLALIFTLLFSVLKWIR
KKFPPIHFKQPFKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL

Inserto quimérico C de la secuencia de aminoácidos mo/huCD137 (dominio humano rico en cisteína 1 a 3; secuencia de ratón del dominio rico en cisteína 4 directo).

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPTNSF
SSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKECSSTSNAECDCTPGFIIICLGAGCSMCEQDC
KQGQELTKKGCKTCSLCTFNDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTCTTEKDVVC
CGPPVVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSIQVLTLFLALTSALLLALIFTLLFSVLKWI
RKKFPPIHFKQPFKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL

- 5 inserto quimérico D Secuencia de aminoácidos mo/huCD137 (dominio humano rico en cisteína 1 a 4; secuencia de ratón del dominio bisagra directo).

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLODPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPTNSF
SSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKECSSTSNAECDCTPGFIIICLGAGCSMCEQDC
KQGQELTKKGCKDCCFGTENDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVC
GPPVVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSIQVLTLFLALTSALLLALIFTLLFSVLKWIR
KKFPPIHFKQPFKKTTGAAQEEDACSCRCPQEEEGGGGGYEL

inserto quimérico E DE Secuencia de aminoácidos mo/huCD137 (dominio rico en cisteína 1 de ratón; secuencia humana del dominio rico en cisteína 2 directo).

MGNNCYNVVVIVLLLVGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFCKYNPVCKPCPPNS
ESSAGGQRTCDICRQCKGVFTRTRKECSSTSNAECDCTPGFIIICLGAGCSMCEQDC
CKQGQELTKKGCKDCCFGTENDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVC
GPPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVY
KRGKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

10

inserto quimérico F de la secuencia de aminoácidos mo/huCD137 (dominio rico en cisteína 1 y 2 de ratón; secuencia humana del dominio rico en cisteína 3 directo).

MGNNCYNVVVIVLLLVGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFCKYNPVCKSCPPSTF
SSIGGQPNPNCNCRVCAGYFRFKKFCSTHNAECDCTPGFIIICLGAGCSMCEQDC
KQGQELTKKGCKDCCFGTENDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVC
GPPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVYK
RGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

15

Inserto quimérico G de la secuencia de aminoácidos mo/huCD137 (dominio rico en cisteína 1 a 3 de ratón; secuencia humana del dominio rico en cisteína 4 directo).

MGNNCYNVVVIVLLLVGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFCKYNPVCKSCPPSTF
SSIGGQPNPNCNCRVCAGYFRFKKFCSTHNAECECEIEGFHCLGPQCTRCEKDCR
PGQELTKQGCKDCCFGTENDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCG
PSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVYKR
GRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

Inserto quimérico H de la secuencia de aminoácidos mo/huCD137 (dominio rico en cisteína 1 a 4 de ratón; secuencia humana desde el dominio bisagra directo).

MGNNCYNVVVIVLLLVGCEKVGAVQNSCDNCQPGTFCKYNPVCKSCPPSTF
 SSIGGQPNONICRVCAGYFRFKKPCSSSTHNAECFCIEGFUICLGPQCTRCCKDCR
 PGQELTKQGUKTCSLGTENDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVC
GPSPADLSPGASSVTTPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLFLTLRESVYK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEREEGGCEL

En base a los resultados FACS obtenidos con las construcciones quiméricas y de longitud completa de CD137 humano y de ratón, se combinaron los clones en base a los patrones de unión observados. Se consideró que los anticuerpos se unían al CD137 (quimérico) cuando la MFI era al menos tres veces la de la misma población celular teñida con un anticuerpo (control negativo) de no unión (dirigido al toxoide tetánico).

Resultados

Las especificidades de dominio de los brazos Fab específicos de CD137 se representan en la Tabla 2.

- 10 **Ejemplo comparativo:** Combinación de los brazos Fab específicos huOX40 presentes en la IgG biespecífica OX40xTT sobre la capacidad para bloquear la interacción de OX40 con OX40L.

Se probaron clones de unión de huOX40 en formato IgG biespecífico (OX40xTT) para comprobar su capacidad de bloquear la interacción de OX40 con OX40L. Por lo tanto, los pocillos de una placa Maxisorp de 96 pocillos se recubrieron con huOX40-Fc recombinante (R&D; No. de cat. 3388-OX) a 0.156 µg/ml en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron dos veces con PBST (Tween20 al 0.05 % v/v en PBS), y posteriormente se bloquearon con leche desnatada en polvo (ELK) al 4 % en PBS (tampón de bloqueo) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con 0.016 µg/ml de OX40L (R&D; No. de cat. 1054-OX) diluido en tampón de bloqueo en presencia o ausencia de IgG biespecífica OX40xTT a 20 µg/ml. A continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con PBST y posteriormente se incubaron durante una hora con un anticuerpo anti-OX40L biotinilado (R&D; No. de cat. BAF1054) diluido en BSA/PBS al 2 % a 0.5 µg/ml. A continuación, se repitieron las etapas de lavado y se incubaron los pocillos con estreptavidina conjugada con HRP (Becton Dickinson; No. de cat. 554066) diluida 1:2000 en BSA/PBS al 2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para la detección de la estreptavidina unida, los pocillos se lavaron tres veces con PBST y se incubaron con los componentes A y B del sustrato TMB (relación 1:1) (Becton Dickinson; No. de cat. 51-2606KC y 51-2607KC, respectivamente). La reacción se detuvo después de 10 minutos con H₂SO₄ 1M y se midió la OD_{450nm} utilizando un lector de placas ELISA.

En base a los resultados, los clones se combinaron en 2 grupos diferentes: los "Clones bloqueantes" redujeron la señal de ELISA >24 % a una concentración de IgG (OX40xTT) de 20 µg/ml, en comparación con un control en el que se agregó un anticuerpo de competencia específico de TT (0 % de bloqueo); los "Clones no bloqueantes" mostraron una señal de ELISA que era menor del 24 % redujeron o mejoraron la señal de ELISA. Este experimento se realizó dos veces, con diferentes subconjuntos de clones de unión a huOX40 en formato IgG biespecífico (OX40xTT). Los resultados del panel de anticuerpos OX40 probados como moléculas biespecíficas OX40xTT se indican en la Tabla 5.

- 35 **Ejemplo comparativo:** Combinación de los brazos Fab específicos de huOX40 presentes en la IgG biespecífica OX40xTT sobre la especificidad de dominio

Los clones de unión huOX40 en formato IgG OX40xTT biespecífico se probaron para especificidad de dominio en FACS en células HEK293T que se transfectaron transitoriamente con ocho construcciones de expresión híbridos pIRES-Neo3 rata/humano OX40 diferentes (véanse las secuencias de inserción de aminoácidos a continuación), la construcción de expresión pIRES-Neo3_raOX40 o pIRES-Neo3_huOX40 utilizada para la generación de células Freestyle 293F estables que expresan raOX40 y huOX40 (Tabla 1). Se utilizó el mismo protocolo FACS descrito anteriormente durante el análisis de especificidad del panel de anticuerpos. Para la generación de las construcciones híbridas se dividió el dominio extracelular de la OX40 humana y de rata en 5 dominios; 4 dominios ricos en cisteína basados en las secuencias de referencia Uniprot P43489 (huOX40) y P15725 (raOX40) y 1 dominio bisagra desde el extremo del dominio rico en cisteína 4 hasta el dominio transmembrana. Las siguientes secuencias de aminoácidos insertadas se clonaron en pIRES-Neo3 (Figura 4) mediante NheI/EcoRI; el texto en negrita es el péptido de señal. El texto subrayado es la secuencia idéntica a la OX40 humana. El texto en cursiva representa las secuencias de los dominios transmembrana e intracelular.

Inserto quimérico A de la secuencia de aminoácidos ra/huOX40 (dominio humano rico en cisteína 1; secuencia de rata del dominio rico en cisteína 2 directo).

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGN
GMVSRCSRSQNTVCRPCPGFYNEAVNYDTCKQCTQCNIIRSGSELKQNCTPTE
DTVCQCRPGTQPRQDSSHKLGVDCVPCPPGHFSPGSNQACKPWTNCTLSGKQI
RHPASNSLDTVCEDRSLLATLLWETQRTTFRPTTVPSTTVWPRTSQLPSTPTLV
APEGPAFAVILGLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRSPNTPKPCWGNSEFTPIQEE
QTDTHFTLAKI

Inserto quimérico B de la secuencia de aminoácidos ra/huOX40 (dominio humano rico en cisteína 1 y 2; secuencia de rata del dominio rico en cisteína 3 directo).

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGN
GMVSRCSRSQNTVCRPCPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ
DTVCQCRPGTQPRQDSSHKLGVDCVPCPPGHFSPGSNQACKPWTNCTLSGKQI
RHPASNSLDTVCEDRSLLATLLWETQRTTFRPTTVPSTTVWPRTSQLPSTPTLV
APEGPAFAVILGLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRSPNTPKPCWGNSEFTPIQEE
QTDTHFTLAKI

5

Inserto quimérico C de la secuencia de aminoácidos ra/huOX40 (dominio humano rico en cisteína 1 a 3; secuencia de rata del dominio rico en cisteína 4 directo).

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGN
GMVSRCSRSQNTVCRPCPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ
DTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGSNQACKPWTNCTLSGKQIRH
PASNSLDTVCEDRSLLATLLWETQRTTFRPTTVPSTTVWPRTSQLPSTPTLV
GAFAVILGLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRSPNTPKPCWGNSEFTPIQEEQT
DTHFTLAKI

10

Inserto quimérico D de la secuencia de aminoácidos ra/huOX40 (dominio humano rico en cisteína 1 a 4; secuencia de rata del dominio bisagra directo).

MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGN
GMVSRCSRSQNTVCRPCPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQ
DTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTL
QPASNSSDAICEDRSLLATLLWETQRTTFRPTTVPSTTVWPRTSQLPSTPTLV
EGPAFAVILGLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRSPNTPKPCWGNSEFTPIQEEQ
TDTHFTLAKI

Inserto quimérico E de la secuencia de aminoácidos ra/huOX40 (dominio rico en cisteína 1 de rata; secuencia humana del dominio rico en cisteína 2 directo).

MYVWVQQPTAFLLLGLSLGVTVKLNCVKDTYPSGHKCCRECQPGHGMVSR
DHTRDTVCHPCPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRC
RAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSS
DAICEDRDPPATQPPQETQGPPARPTTVQPTFAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVA
AILGLGLVILGLLPLAILLALYLLRRDQRLPPDAIKPPGGGSEFTPIQEEQADAIL
STLAKI

15

Inserto quimérico F de la secuencia de aminoácidos ra/huOX40 (dominio rico en cisteína 1 y 2 de rata; secuencia humana del dominio rico en cisteína 3 directo).

MYVWVQQPTAFLLLGSLGVTVKLNCVKDTYPSGHKCCRECQPGHGMVSR
 DHTRDTVCHPCEPGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTEDTVCR
 CRACTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNS
 SDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAI
AAAILGLGLVGLLGLPLAAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADA
IISTLAKI

Inserto quimérico G de la secuencia de aminoácidos ra/huOX40 (dominio rico en cisteína 1 a 3 de rata; secuencia humana del dominio rico en cisteína 4 directo).

MYVWVQQPTAFLLLGSLGVTVKLNCVKDTYPSGHKCCRECQPGHGMVSR
 DHTRDTVCHPCEPGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTEDTVCR
 CRPGTQPRQDSSIIKLGVDVPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPAS
 NSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGR
AVAAAILGLGLVGLLGLPLAAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQA
DAHSTLAKI

- 5 Inserto quimérico H de la secuencia de aminoácidos ra/huOX40 (dominio rico en cisteína 1 a 4 de rata; secuencia humana desde el dominio bisagra directo).

MYVWVQQPTAFLLLGSLGVTVKLNCVKDTYPSGHKCCRECQPGHGMVSR
 DHTRDTVCHPCEPGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCTPTEDTVCR
 CRPGTQPRQDSSIIKLGVDVPCPPGHFSPGSNQACKPWTNCTLSGKQIRIIPAS
 NSLDTVCEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGR
AVAAAILGLGLVGLLGLPLAAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQA
DAHSTLAKI

- 10 En base a los resultados FACS obtenidos con las construcciones OX40 quiméricas y de longitud completa de rata y humano, se combinaron los clones en base a los patrones de unión observados. Se consideró que los anticuerpos se unían al OX40 (quimérico) cuando la MFI era al menos tres veces la de la misma población celular teñida con un anticuerpo (control negativo) de no unión (dirigido al toxoide tetánico).

Los resultados de los clones de unión huOX40 en formato IgG OX40xTT biespecífico se dan en la Tabla 5.

Combinación de brazos Fab específicos de huPD-L1 presentes en la IgG biespecífica PD-L1xTT sobre la capacidad para bloquear la interacción PD-1/PD-L1

- 15 Se probaron 14 clones de unión a huPD-L1 (secuencias VH representadas en la Figura 3) para determinar su capacidad de bloquear la interacción de PD-L1 con PD-1, y su capacidad de bloquear la interacción entre PD-L1 y CD80. Para ello, se recubrió PD1-Fc (R&D systems; No. de cat. 1086-PD) o CD80-Fc (R&D systems; No. de cat. 140-B1) en una placa maxisorp a 1 y 3 µg/ml, respectivamente. Los pocillos recubiertos se bloquearon con BSA al 4 % en PBS. A continuación, se agregaron 0.55 µg/ml de PD-L1 biotinilada (BPS bioscience; No. de cat. 71105) en presencia o ausencia de IgG biespecífica huPD-L1xTT en un rango de 0.15 a 20 µg/ml. La PD-L1 biotinilada unida se detectó con estreptavidina conjugada con HRP (BD bioscience; No. de cat. 554066) diluida 1:2000 en tampón de bloqueo. Después de cada etapa de incubación, la placa ELISA se lavó tres veces con PBS-T (PBS-Tween 20 al 0.05 % v/v). La estreptavidina unida se visualizó mediante tinción con TMB/H₂O₂ y la tinción se cuantificó mediante la medición de la OD_{450nm}. Se consideró que los clones bloqueaban la interacción de PD-1 con PD-L1 cuando la señal ELISA se reducía más del 70 % a una concentración de IgG (PD-L1xTT) de 10 µg/ml, en comparación con un control en el que se agregaba un anticuerpo de competencia específico de TT. Véase la Figura 10 para los resultados obtenidos con una selección representativa del panel de anticuerpos PD-L1 probados como moléculas biespecíficas PD-L1xTT. Excepto para MF5361, los brazos Fab específicos de PD-L1 representados en la Figura 10 bloquean la interacción PD-1/PD-L1 >70 %. Además, todos los demás brazos Fab específicos de PD-L1 que comprenden secuencias MF representadas en la Figura 3 también bloquean la interacción PD-1/PD-L1 >70 % (datos no mostrados).
- 20
- 25
- 30

En conclusión, los brazos Fab específicos de huPD-L1 probados bloquean la interacción PD-1/PD-L1, excepto MF5361.

Clasificación por afinidad de los brazos Fab específicos de huCD137, huOX40 y huPD-L1 presentes en la IgG biespecífica CD137xCD137, OX40xTT y PD-L1xTT

Los anticuerpos biespecíficos que mostraron unirse a los respectivos ortólogos humano y macaco en FACS se clasificaron de acuerdo con la afinidad aparente por ambos ortólogos en FACS. Por lo tanto, las estirpes celulares estables que expresan los ortólogos respectivos (Tabla 1) se cosecharon y diluyeron a 1×10^6 células/ml en tampón FACS (PBS/BSA al 0.5 %/EDTA 0.5 mM). Las células se centrifugaron durante 2 minutos a 300 g a 4 °C. El sobrenadante se desechó al invertir la(s) placa(s). Se agregaron 50 µl de cada muestra de IgG, en una serie de dilución doble de 11 etapas que variaba entre 10 y 0.01 µg/ml, y se incubaron durante 1 h en hielo. Las células se centrifugaron una vez, se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces con 150 µl de tampón FACS. Se agregaron 50 µl diluidos 1:400 de IgG antihumana de cabra PE (Invitrogen) y se incubaron durante 30 minutos en hielo en la oscuridad. Después de agregar el tampón FACS, las células se centrifugaron una vez, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces con tampón FACS. Las células se analizaron en un citómetro de Flujo FACSCanto (Becton and Dickinson) en un entorno HTS. La unión de los anticuerpos a las células se evaluó al medir la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la población celular teñida. Se consideró que los anticuerpos se unían a su diana cuando la MFI era al menos cinco veces superior a la de la misma población celular teñida con un anticuerpo (control negativo) de no unión (dirigido al toxoide tetánico).

Anticuerpos de referencia

Los anticuerpos que inhiben la función de PD-L1 y CD137 y CTLA-4 son conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales bivalentes se construyeron de acuerdo con la información publicada y se expresaron en células 293F Freestyle o CHO-S. El anticuerpo anti-PD-L1 MPDL3280A (sustituto basado en Atezolizumab) se basó en la información divulgada en el documento WO2010077634A1. La información de los anticuerpos anti-CD137 20H4.9 (sustituto basado en Urelumab) y PF-05082566 (sustituto basado en Utomilumab) se obtuvo de los documentos WO 2005/035584 y WO2015119923 respectivamente. La información VH de MOR7480 se obtuvo del documento US8337850 B2 y se reclonó en un estructura principal de IgG1. La información con respecto al anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 (sustituto basado en Ipilimumab) se obtuvo de la Publicación PCT No. WO 01/14424.

Ejemplo 4

Materiales y métodos

Aislamiento de PBMC

La sangre total humana se obtuvo de capas leucocitarias (Sanquin) y se diluyó 1:1 con PBS. Se llenaron tubos de Leucosep (Greiner Bio-One No. de cat. 227 290) con 17.5 ml de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences No. de cat. 17-1440-02) calentados a temperatura ambiente (T.A.). Ficoll-Paque Plus se centrifugó durante 30 segundos a 1000 X g a T.A. Se vertieron 30 ml de sangre total diluida. Los tubos se centrifugaron a 1000xg durante 10 minutos a T.A. y se cosechó la interfase mononuclear de PBMC, se lavó dos veces en PBS y se resuspendió en 250 µl de PBS. Se contaron las PBMC y se reajustaron a 1×10^6 /ml en medio de cultivo de tejido (DMEM con FCS al 10 %) y se congelaron al agregar un volumen igual de medio de congelación helado (medio de cultivo al 80 %/DMSO al 20 %). Las células se almacenaron en alícuotas de 1 ml a -150 °C hasta uso posterior.

Ensayo de activación de células T

Se descongelaron las PBMC y se agregaron 9 volúmenes de medio de cultivo (RPMI1640 con L-glutamina y FBS inactivado por calor al 10 %). Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 150 g a T.A. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo y se dejó reposar a las células al incubarlo durante la noche en un tubo falcon de 50 ml a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. Al día siguiente, se aislaron los linfocitos T utilizando el procedimiento de purificación Easy Sep de enriquecimiento de células T (pan CD3) descrito por el fabricante (Stem cell Technologies cat #19051). El procedimiento EasySep utiliza selección negativa. Brevemente, las PBMC se centrifugaron durante 10 minutos a 150 g a T.A. El sedimento celular se resuspendió en 2 ml de PBS + FBS al 2 % con EDTA 1 mM. La suspensión celular se filtró a través de un colador de nailon de malla de 30 µm. Se contaron las células y se reajustaron a 5×10^7 células/ml en PBS + FBS al 2 % con EDTA 1 mM. Se agregaron 50 µl de cóctel de Enriquecimiento de Células T Humanas EasySep a cada volumen de células de 2 ml, se mezclaron y se dejaron incubar durante 10 minutos a T.A. A continuación, se agregaron 50 µl de EasySep D

Se agregaron Partículas Magnéticas a cada volumen celular de 2 ml y se dejaron incubar durante 5 minutos a T.A. El volumen total se llevó a 2.5 ml con PBS + FBS al 2 % con EDTA 1 mM. A continuación, se colocó el tubo en el imán y se dejó que la fracción celular no deseada se uniera al imán durante 5 minutos a T.A. A continuación, se invirtió el tubo y la fracción de células T purificadas se vertió en un nuevo tubo, las células se cosecharon mediante centrifugación durante 10 minutos a 150 g a T.A. y posteriormente se resuspendieron a una concentración de 1×10^5 células/ml en medio de cultivo. Para el ensayo de activación de células T, los

- pocillos interiores de una placa de 96 pocillos (placas de fondo plano de 96 pocillos Cellstar #655180) se recubrieron durante la noche con 30 µg/ml de anti-CD3 UCHT1 en PBS. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS. Se prepararon diluciones del anticuerpo (80 µg/ml) y se incubaron en una relación 1:1 con un anticuerpo de entrecruzamiento aHulgG-Fc (Bethyl No. de cat. #A80-104A) durante 15 minutos a T.A. A continuación, se prepararon diluciones seriadas de la mezcla. Se agregaron 100 µl de los anticuerpos entrecruzados a cada pocillo, seguidos de 100 µl de suspensión de células T purificadas. Cada placa contenía una dilución en serie del anticuerpo de control negativo (PG1337) y positivo (Urelumab) que sirvieron como controles de referencia. Los cultivos de células T se estimularon durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa antes de analizar la secreción de IL-2 y/o la expresión de antígenos en la superficie celular. La concentración de IL-2 liberada se determinó mediante AlphaLISA (Perkin Elmer No. de cat. #AL221C). La expresión de antígenos de la superficie celular relacionados con la inhibición del punto de control o antígenos coestimuladores se determinó mediante citometría de flujo.

Ensayo SEB

- La actividad funcional de los anticuerpos biespecíficos se determinó al utilizar PBMC estimuladas por enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB). La SEB activa específicamente las células T que expresan la cadena de receptores de células T V63 y Vβ8. Las PBMC de 3 donantes se descongelaron, lavaron, contaron y resuspendieron en medio de cultivo (RPMI1640 más FBS inactivado por calor al 10 %) hasta una concentración de 2x10⁶ células/ml. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos de fondo plano (2x10⁵ células/pocillo) en presencia de SEB (2000 o 125 ng/ml). Se agregaron diluciones seriadas del anticuerpo a partir de 20 µg/ml. Cada placa contenía una dilución seriada de anticuerpo de control negativo (PG1337) y positivo (basado en ipilimumab) que sirvieron como controles de referencia. Las células se estimularon durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa antes de probar la secreción de citocinas y/o la expresión de antígenos en la superficie celular.

Ensayo indicador de bloqueo PD-1/PD-L1

- Los ensayos indicadores de bloqueo PD-1/PD-L1 utilizados fueron desarrollados por Promega y se basan en un sistema de dos células; células CHO que expresan PD-L1, y un activador de células T y una estirpe celular indicadora Jurkat/NFAT-RE que sobreexpresa PD-1. Los ensayos indicadores de bloqueo PD-1/PD-L1 se realizaron utilizando el formato de descongelar y utilizar de Promega. Las células CHO que expresan PD-L1 (No. de cat. C187103) se descongelaron en 14.5 ml de medio de recuperación celular (DMEM/F12 con un FBS al 10 %). A continuación, se agregaron 50 µl de suspensión celular a los pocillos interiores de una placa de 96 pocillos de media área (Corning, No. de cat. 3688). Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron a cada pocillo 20 µl de anticuerpo de prueba en medio de ensayo (RPMI 1640 que contenía FBS al 4 %) en una dilución en serie (concentración inicial de 10 µg/ml). Cada placa contenía una dilución en serie de anticuerpo de control negativo (PG1337) y positivo (basado en Nivolumab/MPDL3280A) que sirvieron como controles de referencia. Las células efectoras de PD-1 (No. de cat. C187105) se descongelaron en 5.9 ml de medio de ensayo y se agregaron 20 µl de suspensión celular a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 6 h o toda la noche a 37 °C, 5 % de CO₂ con una humedad relativa del 95 %. Al día siguiente, se agregaron 40 µl de luciferasa (Sistema de Ensayo de Luciferasa Bio-Glo, No. de cat. G794L) y se midió la cantidad de actividad de la luciferasa utilizando un lector de Microplacas Multimodo BioTek Synergy 2. La potencia se midió como la actividad de la luciferasa. La potencia se midió como actividad de luciferasa en comparación con el anticuerpo de control negativo.

Cribado del panel de anticuerpos PD-L1

- Las VH del panel de anticuerpos PD-L1 se reclonaron en los vectores silenciados Fc de ingeniería cargada de tal manera que luego de la expresión de las cadenas pesadas del anticuerpo se fuerza la heterodimerización de las cadenas pesadas resultando en la generación de anticuerpos biespecíficos después de la transfección. Los brazos Fab de PD-L1 se reclonaron en el vector MV1624. Los anticuerpos PD-L1 se combinaron con MF1337, un brazo Fab dirigido a TT, para generar anticuerpos biespecíficos que se dirigen a PD-L1 de forma monovalente. El panel de anticuerpos contra PD-L1 en formato monovalente se clasificó de acuerdo con su actividad como se muestra en la Tabla 3.

Ensayos de citocinas

- ELISA: Después de la estimulación de las células T o PBMC en varios momentos, las placas se centrifugaron y se eliminó el medio. Los niveles de citocinas se detectaron mediante AlphaLISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Perkin Elmer). Las concentraciones se calcularon en base a la curva estándar.
- Ensayo Luminex: Otro método utilizado para determinar la producción de citocinas in vitro fue utilizar el análisis multiplex desarrollado por eBioscience. Se midieron los niveles de IFN-γ, IL-2 y TNF-α en sobrenadantes de cultivo siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron mediante el software de análisis de eBioscience.

Generación de Jurkat CD137-NFκBluc

Se generó una estirpe celular indicadora estable Jurkat CD137-NFκBluc al integrar de forma estable una construcción CD137 de longitud completa y una construcción indicadora de luciferasa NF-κB en células Jurkat E6. Por lo tanto se transfectó el CD137 MV1604 [pIRESneo3] (Clontech) de longitud completa y se generaron clones estables que expresaban CD137 tras la selección con antibióticos. A continuación, se transfectó la construcción informadora de luciferasa NF-κB pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] (Promega) en el clon con la mayor expresión de CD137 y se seleccionaron clones estables que expresaban tanto CD137 como luciferasa NF-κB tras la selección con antibióticos. Los clones se seleccionaron por su capacidad de responder a CD137L tras la activación inicial mediante anticuerpos CD3 unidos a placa (clon OKT-3) y PMA/ionomicina. El clon que mostró la mayor ventana de activación se utilizó como formato de descongelación y uso en el ensayo indicador de CD137.

Ensayo indicador de CD137

Para el ensayo de activación directa de CD137 se cubrieron placas de 96 pocillos (Costar, No. de cat. 3917) durante la noche con 2 µg/ml de anti-CD3 (OKT3) en PBS. Para el ensayo de activación de CD137 mediado por entrecruzamiento, las placas de 96 pocillos (Costar, No. de cat. 3917) se recubrieron durante la noche con 2 µg/ml de anti-CD3 en PBS + 10 µg/ml de IgG antihumana (Bethyl, No. de cat. A80-104A). Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS. Las células Jurkat CD137-NFκBluc anteriormente mencionadas se descongelaron y lavaron con medio DMEM/F12 que contenía suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (medio de ensayo). Las células se resuspendieron a una densidad de 2x10⁶ células/ml. Se sembraron en placas 25 µl de suspensión celular en los pocillos interiores de la placa de ensayo de 96 pocillos recubierta. Se agregaron 25 µl de anticuerpo de prueba en una dilución en serie a cada pocillo (concentración inicial de 20 µg/ml), seguidos de 25 µl de medio de ensayo. Cada placa contenía una dilución en serie de anticuerpo de control negativo (PG1337) y positivo que sirvieron como controles de referencia. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. Al día siguiente se agregaron 50 µl de luciferasa (Promega, Bright-Glo™, No. de cat. E2610) y se midió la cantidad de actividad de la luciferasa utilizando un Lector de Microplacas Multimodo BioTek Synergy 2.

Producción a gran escala de anticuerpos biespecíficos

Las proteínas se produjeron en células FreeStyle™ 293-F (Invitrogen) utilizando polietilenimina (PEI) como reactivo de transfección con una relación de masa PEI/ADN de 2.5:1. Los anticuerpos biespecíficos se transfectaron utilizando una relación de masa de ADN de 1:1 a escala 0.4-2L. Los anticuerpos biespecíficos se transfectaron utilizando una relación de masa de ADN 1:1 a escala 0.4-2L. Los sobrenadantes celulares se purificaron mediante incubación por lotes con sefarosa MabSelect SuRe LX (GE Healthcare), seguida de elución ácida y neutralización con Tris. A continuación, las proteínas se desalaron y centrifugaron, y se purificaron mediante intercambio catiónico utilizando una columna Resource S (GE Healthcare) equilibrada en tampón fosfato 25 mM pH 6.0. Se utilizó un gradiente de elución para NaCl 1M para eluir las proteínas y las fracciones que contenían proteínas se recolectaron y analizaron utilizando geles de proteínas NuPAGE Bis-Tris 4-12 % (Invitrogen). Las fracciones que contenían anticuerpos biespecíficos se agruparon y se aplicaron a una columna de filtración en gel Superdex200 26/600 (GE Healthcare) equilibrada en PBS. Se recolectaron las fracciones y se analizaron en NuPAGE, después de lo cual se agruparon las fracciones que contenían anticuerpos monoméricos y se filtraron estérilmente (0.22 µm).

Resultados

Ensayo indicador de CD137

El panel de anticuerpos bivalentes de CD137 se cribó en el ensayo indicador de activación directa de CD137 anteriormente mencionado. En la Figura 11 se muestra una figura representativa de una selección de los anticuerpos. El 60 % del panel de anticuerpos fue capaz de activar directamente CD137 en grado variable.

Panel de cribado de anticuerpos CD137xPD-L1

Una limitación de los anticuerpos bivalentes CD137 en el desarrollo de fármacos contra el cáncer es la activación sistémica de las células que expresan CD137. Esto puede conducir a la toxicidad del anticuerpo, debido a la orientación inespecífica [Melero, 2013]. Los anticuerpos biespecíficos pueden superar esta limitación al dirigirse selectivamente a las células, ya sea al dirigirse a células que coexpresan ambas dianas, tales como dos antígenos tumorales, o al dirigirse a dos células diferentes cada una de las cuales expresa una de las dianas. Esto último sólo puede ocurrir cuando las células están muy próximas entre sí. Para investigar la posibilidad de una activación selectiva de CD137, se generaron anticuerpos biespecíficos compuestos de un brazo Fab dirigido a CD137 y un brazo Fab dirigido a PD-L1. PD-L1 representa tanto un antígeno presente en altas concentraciones en las células tumorales como un antígeno altamente expresado en las células T activadas presentes en el sitio del tumor [Pulko et al, 2011]. Como tal, el anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 sería capaz de activar CD137 en 'cis' cuando se dirige a CD137 y PD-L1 en la misma célula o en 'trans' cuando se dirige a CD137 en células inmunitarias y PD-L1 en células adyacentes. Además de este mecanismo,

la inclusión de un brazo Fab bloqueador de PD-1 podría convertir una señal inhibidora en una señal estimuladora.

Las VH del panel de anticuerpos CD137 y PD-L1 se reclonaron en los vectores silenciados Fc de ingeniería cargada de tal manera que tras la expresión de las cadenas pesadas del anticuerpo se fuerza la heterodimerización de las cadenas pesadas resultando en la generación de anticuerpos biespecíficos después de la transfección. Se produjeron en formato de 24 pocillos un total de 320 anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 que comprendían 40 brazos Fab CD137 diferentes y los 8 brazos Fab PD-L1 diferentes representados en la Tabla 3 y se purificaron como IgG. Se comprobó la capacidad de todos los anticuerpos para inducir la expresión de luciferasa dependiente de la dosis en el sistema indicador CD137-luc directamente o en presencia de un anticuerpo de entrecruzamiento IgG antihumano. Los anticuerpos sustitutos 20H4.9 y MOR7480 se incluyeron como anticuerpos de referencia en los ensayos respectivos.

En la Figura 12 se muestra un ejemplo de la actividad funcional en el ensayo indicador CD137-luc de varios anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 en ausencia o presencia del anticuerpo de entrecruzamiento IgG antihumano. La figura muestra que la capacidad de los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 para activar la actividad luciferasa inducida por CD137 depende en gran medida del entrecruzamiento por el anticuerpo de IgG antihumano, ya que esto aumenta la magnitud de la actividad luciferasa en un 25 %. También se ha observado una mejora significativa de la producción de IFN- γ después de la ligadura de CD137 con el anticuerpo anti-CD137 conocido en la técnica como 20H4.9 (WO 2005/035584). El 25 % superior CD137xPD-L1 del panel de anticuerpos biespecíficos estaba compuesto por 22 brazos Fab de CD137 en combinación con uno a siete brazos Fab de PD-L1 del panel total de ocho brazos Fab de PD-L1.

A continuación se probó el panel de anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 del 25 % superior para determinar su capacidad de inducir la liberación de IL-2 en un ensayo de activación de células T primarias en comparación con los anticuerpos CD137 parentales bivalentes y el brazo Fab CD137 parental combinado con un brazo Fab irrelevante dirigido al toxoide tetánico. En esta configuración experimental se pudo monitorizar la activación monovalente frente a la activación bivalente. El panel superior de la Figura 13 muestra un ejemplo de un conjunto de tres anticuerpos que inducen la secreción de IL-2 tras la activación de CD137 si se presentan en un formato bivalente CD137x CD137 en el rango del anticuerpo de referencia 20H4.9. Por el contrario, como se muestra en el panel inferior de la Figura 13, ninguno de los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 fue capaz de inducir la secreción de IL-2 al nivel del Fab parental CD137 bivalente. Todos los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 visualizaron la misma actividad que las variantes CD137xTT, lo que indica que los complejos de señalización CD137 no podían formarse eficazmente al unirse a CD137 y PD-L1 en la misma superficie celular (unión en 'cis'). La falta de activación de células T *in cis* de este panel de anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 es ventajosa, ya que esto disminuye el potencial de toxicidad *in vivo* debido a la activación inespecífica de células T.

Ensayo de transactivación

Para probar si los anticuerpos CD137xPD-L1 biespecíficos podrían activar CD137 en 'trans', se probaron los anticuerpos biespecíficos en un ensayo de dos células en el que la señalización de CD137 en las células inmunitarias se produciría a través del entrecruzamiento por una segunda célula. El ensayo *in vitro* se compuso de dos estirpes celulares diferentes, es decir células CHO-PD-L1 que imitaban las células tumorales que expresaban PD-L1 y células indicadoras Jurkat CD137-luc que representaban las células inmunitarias. Se utilizó la misma configuración de ensayo que en el indicador CD137-luc, con anti-CD3 recubierto que proporcionaba la primera señal de activación de células T. La relación de células diana efectoras utilizada fue de 4:1, las células diana son células CHO de tipo silvestre o células CHO-PD-L1. La Figura 14 muestra un ejemplo en el que los anticuerpos biespecíficos CD137 PB14671 y PB14580, que se componen del mismo brazo Fab de CD137 (MF6744) y dos brazos Fab de PD-L1 diferentes (MF5361 o MF5594, respectivamente) fueron ambos capaces de inducir actividad de células informadoras de CD137 en presencia de células CHO-PD-L1 mientras que no se produjo estimulación de CD137 en presencia de células CHO de tipo silvestre. Además, los anticuerpos biespecíficos CD137 PB14681 y PB14590, que se componen del mismo brazo CD137Fab (MF6783) y dos brazos diferentes PD-L1 Fab (MF5361 o MF5594, respectivamente) fueron capaces de inducir la actividad de células indicadoras CD137 en presencia de células CHO-PD-L1, mientras que no se produjo estimulación CD137 en presencia de células CHO de tipo silvestre. Más aún, todos los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 fueron tan potentes como el anticuerpo de control de referencia 20H4.9. Una combinación de los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 PB14580 y PB14671 (formato Oligoclones®) indujo una elevada actividad de luciferasa.

Ensayo de transactivación con células T primarias

El ensayo de transactivación se reformateó a células primarias al agregar células CHO de tipo silvestre o CHO-PD-L1 en el ensayo de activación de células T. Se utilizó una relación de células diana efectoras al inicio del ensayo de 1:1.8 para células CHO-PD-L1 y CHO de tipo silvestre. Para el ensayo de activación de células T, los pocillos interiores de las placas de 96 pocillos (placas de fondo plano de 96 pocillos - Cellstar #655180) se recubrieron durante la noche con 30 μ g/ml de anti-CD3 OKT-3 en PBS. Al día siguiente, las placas se lavaron

con PBS. Se agregaron 50 µl de solución de anticuerpo, seguidos de 25 µl de suspensión de células T purificadas de 2x10⁶ células/pocillo y 25 µl de CHO-K1 o CHO-PD-L1 purificados en las relaciones como se indicó anteriormente por pocillo. Los cultivos se estimularon durante 3 días a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa antes de probar la secreción de IL-2. Se determinó la concentración de IL-2 liberada en el cultivo. La concentración de IL-2 liberada se determinó mediante AlphaLISA (Perkin Elmer No. de cat. #AL221C).

Se probaron dos anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 (PB14671 y PB14580), así como el formato Oligoclonics® y un formato CD137xTT. La liberación de IL-2 en el día 3 representada en la Figura 15 muestra que los anticuerpos CD137xPD-L1 indujeron la producción de IL-2 en células T en presencia de células CHO-PD-L1 en mayor medida que el anticuerpo de control 20H4.9. Más aún, el formato CD137xTT no consiguió inducir la liberación de IL-2. En presencia de células CHO de tipo silvestre, los niveles de IL-2 se producen a niveles de fondo, con la excepción del anticuerpo de control 20H4.9. Una combinación de los dos anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 (formato Oligoclonics®) indujo una elevada actividad luciferasa, confirmando de esta manera el experimento anterior. El formato Oligoclonics® puede estar dirigido al mismo epítipo CD137 y a dos epítopos PD-L1 diferentes (como se muestra en las Figuras 14 y 15) o estar dirigido a dos dominios CD137 diferentes y a dos dominios PD-L1 diferentes.

Ensayo SEB

Para probar los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 en un entorno fisiológico en el que están presentes APC que expresan PD-L1, ambos anticuerpos CD137xPD-L1 (PB14671 y PB14580), los anticuerpos CD137xTT y el formato Oligoclonics® se probaron en el ensayo SEB. Uno de los anticuerpos biespecíficos CD 13 7xPD- L1 (PB14580) mostró una mayor activación en comparación con los anticuerpos de control negativo y fue mucho más potente en comparación con los anticuerpos de referencia dirigidos a CD137 (20H4.9) o PD-L1 (MPDL3280A); véase la Figura 16. La inducción de IL-2 por el formato Oligoclonics® CD137xPD-L1 también fue potente.

Pruebas adicionales

Se combinó un panel de 24 brazos Fab anti-CD137 que representaban los once grupos diferentes de CD137 A-K (Tabla 2) con siete brazos Fab bloqueantes específicos de PD-L1 y un brazo Fab no bloqueante específico de PD-L1 (Tabla 3) y se produjeron en formato de 24 pocillos. Los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 producidos se probaron posteriormente en una titulación en serie para determinar su capacidad de inducir la expresión de luciferasa dependiente de la dosis en el sistema indicador CD137-luc en presencia de células CHO-PD-L1 o células CHO de tipo silvestre. Se incluyeron como anticuerpos de referencia el 20H4.9 y el anticuerpo de control negativo (Figura 19). Se seleccionaron los anticuerpos (56 en total) que mostraron la mayor inducción de luciferasa y se probaron en una titulación en serie en el ensayo de células T activadas en presencia o ausencia de células CHO-PD-L1 o células CHO de tipo silvestre. En paralelo, los anticuerpos se probaron en el ensayo SEB. Como lectura de la activación de CD137, se midió la liberación de IL-2. En la Tabla 7 se muestra un resumen de las características y la actividad de los 24 anticuerpos biespecíficos probados en el ensayo de activación de células T. Los doce brazos Fab de CD137 que se encontraron activos para ambos brazos PD-L1 en tanto la célula T activada como en el ensayo de SEB, se seleccionaron para combinaciones con 7 brazos Fab de PD-L1 diferentes. Además de producirse como IgG mono específicas bivalentes, los 12 brazos CD137 se produjeron como anticuerpos CD137xPD-L1 biespecíficos/monovalentes, cada uno combinado con uno de los 7 brazos PD-L1 diferentes. Por lo tanto, se probaron un total de 84 anticuerpos CD137xPD-L1 biespecíficos en una titulación dependiente de la dosis en un ensayo SEB con liberación de IL-2 como lectura. Los datos en la Figura 20 muestran que cuando se presentan en un formato CD137xPD-L1, cuatro de los doce brazos Fab CD137 (MF6783, MF6749, MF6737 y MF6788) mostraron una menor potencia en el ensayo SEB en comparación con los otros brazos Fab. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 que comprendían estos cuatro brazos Fab CD137 se excluyeron para pruebas adicionales. Durante las pruebas SEB adicionales, las combinaciones CD137xPD-L1 que comprendían MF6808, MF6763, MF6754, MF6785 y MF6797 indujeron la mayor liberación de citocinas IL-2. (Figura 21). Las combinaciones CD137xPD-L1 que comprenden por MF6805, MF6744 y MF6825 indujeron una menor secreción de citocinas IL-2. La potencia de las combinaciones de CD137xPD-L1 que comprenden MF6808, MF6763, MF6754, MF6785 y MF6797 se analizó adicionalmente durante un ensayo SEB en una titulación en serie al medir la inducción de la liberación de IL-2, IFN γ y TNF α determinada por Luminex multiplex. A continuación, los anticuerpos se clasificaron en base a los valores EC₅₀ de liberación de IL-2 (Tabla 4). Un panel de 28 anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 (Tabla 4) que comprendía cuatro brazos Fab CD137 diferentes mostró la mayor actividad en el ensayo SEB. Estos cuatro brazos Fab de CD137 se podían mapear a la misma región de unión en CD137 (dominio de unión 2) y más aún todos bloqueaban completamente la interacción entre CD137 y CD137L. Ninguno de ellos mostró actividad agonística en el cribado del indicador CD137 de Jurkat como monoclonal bivalente (Figura 17). Los perfiles CIEIX de los 28 anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 demostraron que los anticuerpos CD137xPD-L1 que comprendían un brazo Fab de PD-L1 basado en MF5553 tal como MF7702, tenían perfiles CIEIX óptimos en términos de consideración como anticuerpo candidato principal para la fabricación.

Ejemplo 5

Clasificación por afinidad del panel de anticuerpos anti-CD137

Biacore determinó la afinidad de un panel de Fabs anti-CD137 que inducían la activación de células T en combinación con los brazos Fab de PD-L1 en trans.

- 5 Con este fin, la proteína CD137 recombinante humana se acopló a un chip y un instrumento Biacore T100 analizó la afinidad de los diferentes anticuerpos anti-CD137 en formato monovalente biespecífico: un brazo Fab era específico para CD137 y el otro para un ligando irrelevante, a saber, el toxoide tetánico (TT).

- 10 En estos experimentos, se produjo IgG anti-(CD137xTT) biespecífica por medio de transfección transitoria de las construcciones codificantes en células Freestyle 293F en una producción a pequeña escala (formato de 24 pocillos, véase el ejemplo 2). En cada transfección, se combinó una construcción que codificaba una de las secuencias anti-CD137 seleccionadas con MF1337 que codificaba la secuencia anti-TT.

- 15 A continuación se utilizó la resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento Biacore T100 para determinar las afinidades de los anticuerpos. Con este fin, la proteína huCD137-Fc (RND Systems # 838-4B) se diluyó a 5 µg/ml en tampón de acoplamiento de acetato de sodio, pH 5.0, y se acopló a la superficie de la celda 2 de un chip biosensor CM5, a un nivel de 150 unidades de resonancia (RU). La celda de flujo 1 sirvió como superficie de control negativo. Para determinar las constantes de velocidad de disociación cinética (valores K_{off}), los anticuerpos de prueba se diluyeron en solución salina tamponada con HEPES (HBS) hasta 15 µg/ml (100 nM) y se pasaron por las celdas de flujo 1 y 2 del chip sensor recubierto con CD137 a 30 µl/min. La regeneración se realizó con un pulso de 10 µl de HCl 100 mM. La constante de velocidad de disociación se determinó a partir de los sensorgramas obtenidos (es decir, gráficos de respuesta frente a tiempo) utilizando el ajuste de curvas en el software BIAevaluation.

- 25 Para medir la cinética de unión del panel de anticuerpos y obtener constantes cinéticas de velocidad de asociación y disociación de la unión de anticuerpos a CD137, se pasaron diferentes concentraciones de este subconjunto de anticuerpos de prueba sobre las superficies de las celdas de flujo 1 y 2 de un chip recién recubierto. Los anticuerpos se diluyeron en HBS a 200 nM (es decir, 30 µg/ml), se diluyeron en serie dos veces (4 diluciones, 100 nM – 50 nM – 25 nM – 12.5 nM) y luego se probó su unión al chip en una ejecución cinética a alta velocidad de flujo (30 µl/min). La regeneración se realizó con un pulso de 10 µl de HCl 100 mM. Los sensorgramas obtenidos se analizaron utilizando el software BIAevaluation, y se determinaron las constantes de velocidad de asociación cinética (K_a) y disociación (K_d), generando de esta manera datos sobre las afinidades (valores K_D) de los diferentes brazos Fab anti-CD137. Para cada concentración de anticuerpo, se determinaron por separado las tasas de activación y desactivación y a continuación se promediaron.

Los resultados se muestran en la Tabla 6. Todos los Fabs anti-CD137 ensayados tenían una afinidad en el rango bajo de nM.

Ejemplo comparativo: Ejemplo 6

- 35 Generación de Jurkat OX40-NFκB-luc

- Se generó una estirpe celular indicadora estable Jurkat OX-40-NFκB-luc al integrar de forma estable una construcción OX-40 de longitud completa y una construcción indicadora de luciferasa NF-κB en células Jurkat E6. Por lo tanto, se transfectó OX-40 MV1616 [pIRESneo3](Clontech) de longitud completa y se generaron clones estables que expresaban OX-40 tras la selección con antibióticos. A continuación, se transfectó la construcción informadora de luciferasa NF-κB pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] (Promega) en el clon con la mayor expresión de OX-40 y se seleccionaron clones estables que expresaban tanto OX-40 como luciferasa NF-κB tras la selección con antibióticos. Los clones se seleccionaron por su capacidad de responder a OX-40L después de la activación inicial mediante anticuerpos CD3 unidos a placa (clon OKT-3) y PMA/ionomicina. El clon que mostró la mayor ventana de activación se utilizó como formato de descongelación y uso en el ensayo indicador de OX-40.

Ensayo indicador de OX-40

- Para el ensayo de activación directa de OX-40 y el ensayo de activación de OX-40 mediado por entrecruzamiento, se recubrieron placas de 96 pocillos (Costar, No. de cat. 3917) durante la noche con 2 µg/ml de anti-CD3 (OKT3) en PBS. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS. Se descongelaron las Jurkat OX-40-NFκB-luc y se lavaron con medio DMEM/F12 que contenía un suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (medio de ensayo). Las células se resuspendieron a una densidad de 5×10^5 células/ml. Se sembraron en placa 25 µl de suspensión celular en los pocillos interiores de la placa de ensayo de 96 pocillos recubierta. El anticuerpo de prueba se combinó con un anticuerpo aHuIgG-Fc 2.5 veces (Bethyl, No. de cat. A80-104A) y se prepararon diluciones seriadas (concentración inicial de IgG de prueba 20 µg/ml). Las mezclas de anticuerpos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 50 µl de mezcla de anticuerpos a las células, seguidos de 25 µl de medio de ensayo. Cada placa contenía una dilución en serie de

anticuerpo de control negativo (PG1337) y positivo que sirvieron como controles de referencia. Las placas se incubaron 6H a 37 °C, 5 % de CO y 95 % de humedad relativa. Se agregaron 50 µl de luciferasa (Promega, Bright-Glo™, No. de cat. E2610) y se midió la cantidad de actividad de la luciferasa utilizando un Lector de Microplacas Multimodo BioTek Synergy 2.

- 5 El panel de anticuerpos bivalentes de OX-40 se cribó en el ensayo indicador de activación directa de OX-40 y en el ensayo de activación de células T. Se seleccionaron cuatro brazos Fab de OX-40 diferentes para probar si los anticuerpos OX40xPD-L1 u OX40xPD-1 biespecíficos podrían activar OX40 en 'cis' o 'trans'. Por lo tanto, los anticuerpos biespecíficos se probaron en un sistema de dos células, utilizando células CHO que sobreexpresan PD-L1 y Jurkat OX-40-NFκBluc. PD-L1 se proporcionó en 'trans' en las células CHO y PD-1 en 'cis' en células indicadoras Jurkat OX-40-NFκBluc activadas. Se utilizó la misma configuración de ensayo que en el ensayo Jurkat OX-40-NFκBluc con anti-CD3 recubierto que proporcionaba la primera señal de activación de células T. La relación de células diana efectoras utilizada fue de 4:1, las células diana son células CHO de tipo silvestre o células CHO-PD-L1. La Figura 18 muestra un ejemplo de cuatro brazos Fab de OX40 diferentes combinados con un brazo Fab de bloqueo de PD-L1 (MF5561) o PD-1 (MF6256). Los anticuerpos OX40xPD-L1 indujeron la actividad de la célula informadora OX40 en presencia de células CHO-PD-L1 al mismo nivel que el anticuerpo anti-CTLA4 basado en ipilimumab. Por el contrario, los anticuerpos OX40xPD-1 mostraron una actividad basal. En ausencia de células que expresaran PD-L1, la actividad de los anticuerpos OX40xPD-L1 volvió al nivel de referencia.

Ejemplo 7

- 20 En el Ejemplo 4, se determinó que se prefieren cinco brazos Fab específicos de CD137 en vista de su capacidad de transactivación de células T.

En este Ejemplo se utilizó un panel de tres anticuerpos biespecíficos, consistente en tres brazos candidatos CD137 (6763, 6785 y 6797), y un brazo PD-L1 (7702). Los anticuerpos biespecíficos se produjeron en células 293F Freestyle, y se purificaron mediante protA, CIEX y filtración en gel. Posteriormente, los anticuerpos se probaron en varios ensayos. Probamos los cuatro brazos Fab tanto en formato monoespecífico bivalente parental (anti-CD137 o anti-PD-L1) como en formato biespecífico (anti-CD137xPD-L1) y comparamos estos anticuerpos con el anticuerpo anti-CD137 de referencia 20H4.9, el anticuerpo anti-PD-L1 de referencia YW243.55.S70, y con un anticuerpo de control negativo (anticuerpo anti-RSV PG2708).

- 30 Para los Materiales y Métodos de los ensayos descritos en este Ejemplo, también se hace referencia al Ejemplo 4.

Los anticuerpos se enumeran a continuación.

Nombre del anticuerpo	Secuencias MF	Diana
PB17309	6763 X 7702	CD137 X PD-L1
PB17310	6785 X 7702	CD137 X PD-L1
PB17311	6797 X 7702	CD137 X PD-L1
PG6763	6763 X 6763	CD137
PG6785	6785 X 6785	CD137
PG6797	6797 X 6797	CD137
PG7702	7702 X 7702	PD-L1

Análisis FACS

Especificidad y afinidad del antígeno

- 35 La unión de las IgG monoespecíficas y biespecíficas de CD137 humano (hu) y de cynomolgus (cy) se verificó mediante análisis FACS utilizando clones celulares estables 293FF que expresaban huCD137 o cyCD137. Con este fin, las células se incubaron con una titulación en serie de 8 etapas del anticuerpo y se analizó la intensidad de unión a través de la posterior unión de un anticuerpo secundario, IgG antihumano unido al colorante fluorescente ficoeritrina (PE). En la Figura 22 se muestra la intensidad de unión expresada como fluorescencia PE media para cada uno de los anticuerpos ensayados. De los anticuerpos parentales monoespecíficos anti-CD137, el PG6785 se unió al CD137 humano con la mayor afinidad, seguido del PG6797 y luego del PG6763. El PB17311 biespecífico (6797x7702) se unió al huCD137 con la mayor afinidad, seguido por el PB17309 (6763x7702) y luego PB17310 (6785x7702). De los anticuerpos parentales anti-CD137, el PG6785 se unió de

nuevo al CD137 de cynomolgus con la mayor afinidad, seguido esta vez por el PG6797 y luego el PG6763. El PB17311 biespecífico (6797x7702) se unió al CD137 cynomolgo con la mayor afinidad, seguido del PB17309 (6763x7702) y luego del PB17310 (6785x7702). Cabe destacar, como se muestra en la Figura 22, que cuando los tres brazos Fab específicos de CD137 están presentes en un anticuerpo monovalente biespecífico, son capaces de unirse tanto a huCD137 como a cyCD137 igual de bien, como también se observó en los anticuerpos parentales bivalentes, mono-específicos.

La unión de las IgG mono-específicas y biespecíficas de PD-L1 humana (hu) y de macaco rhesus (re) se verificó mediante análisis FACS utilizando clones de células estables CHO-K1 que expresaban huPD-L1 o rePD-L1. Con este fin, se incubaron las células con una titulación seriada de 8 etapas de anticuerpo y se analizó la intensidad de unión a través de la posterior unión de un anticuerpo secundario, IgG-PE antihumano. En la Figura 23 se muestra la intensidad de unión expresada como intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada uno de los anticuerpos probados. Como era de esperar, los anticuerpos parentales anti-CD137 no se unieron a PD-L1 humana o de macaco rhesus, mientras que el anticuerpo parental anti-PD-L1 PG7702 sí lo hizo. Es importante destacar que los tres anticuerpos biespecíficos se unieron fuertemente a PD-L1, todos con mayor afinidad que el anticuerpo de control positivo. Esto significa que incluso cuando está presente en un anticuerpo monovalente biespecífico, el brazo MF7702 tiene una mayor afinidad para PD-L1 en comparación con el anticuerpo de control bivalente YW243.55.570.

Unión a células T activadas

Probamos la afinidad de unión del panel de anticuerpos para células T activadas. Con este fin, se recolectaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un donante y se dejaron en reposo durante la noche. Posteriormente, se aislaron las células T y se activaron incubándolas durante 3 días en placas recubiertas con el anticuerpo anti-CD3 OKT3. Se cosecharon las células T activadas y se tiñeron con una titulación en serie de las IgG del panel de anticuerpos y con IgG de control. La unión del anticuerpo se midió en FACS a través de la posterior unión de un anticuerpo secundario, IgG-PE antihumano. La intensidad de unión expresada como MFI para cada uno de los anticuerpos probados se muestra en la Figura 24, con la unión de las IgG biespecíficas mostrada a la izquierda y la unión de las IgG mono-específicas de la derecha. PB17311 (6797x7702) mostró la unión más potente. Es importante destacar que las afinidades de unión de los anticuerpos de control positivo fueron inferiores a las de los anticuerpos biespecíficos. Esto significa que los anticuerpos biespecíficos de la presente invención tienen una mayor afinidad por las células T activadas en comparación con el anticuerpo de referencia específico de PD-L1 YW243.55.S70 (basado en Atezolizumab) y el anticuerpo de referencia específico de CD137 20H4.9 (que se basa en Urelumab).

Ensayos de bloqueo de ligandos

Ensayo de competición PD-1/PD-L1

La capacidad de las IgG biespecíficas y mono-específicas para bloquear la unión del ligando PD-L1 se probó en un ELISA de competición PD-1/PD-L1, en el que se esperaba que cantidades crecientes de anticuerpos que contenían un brazo anti-PD-L1 redujeran la cantidad de PD-L1 biotinilado que se podía unir a una placa recubierta con PD-1 Fc. Con este fin, se recubrió una placa maxisorp con 1 µg/ml de PD-1-Fc (R&D; # 1086-PD) y se agregó PD-L1 biotinilado (BPS Bioscience; No. de cat. 71105) en solución en presencia o ausencia de una dilución en serie de cada anticuerpo comenzando con una concentración de 10 µg/ml. La PD-L1 unida se detectó a través de la posterior unión de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP), y la adición de sustrato incoloro que la HRP cataliza en un producto coloreado. La densidad óptica (OD) de la solución, medida a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA, es una indicación de la PD-L1 unida. Las curvas de unión se muestran en la Figura 25, con la unión de las IgG biespecíficas de la izquierda y la unión de las IgG mono-específicas de la derecha. Como era de esperar, el anticuerpo anti-PD-L1 de control positivo mostró un alto nivel de actividad de bloqueo, y el anticuerpo de control negativo no mostró ninguna. Los anticuerpos mono-específicos anti-CD137 también fueron negativos para el bloqueo de PD-L1. En el caso de las IgG que contenían al menos un brazo anti-PD-L1, todas fueron capaces de bloquear la unión PD-1/PD-L1. El anticuerpo mono-específico anti-PD-L1 parental PG7702 resultó ser tan eficaz como el anticuerpo anti-PD-L1 de referencia YW243.55.S70 para bloquear la unión a PD-L1. Todas las IgG biespecíficas presentaron niveles buenos y similares de actividad de bloqueo.

Ensayo de bloqueo del ligando huCD137 basado en células

También se probó la capacidad de las IgG biespecíficas y mono-específicas para bloquear la unión del ligando CD137. Probamos los tres brazos candidatos de CD137 (6763, 6785 y 6797) y el brazo de PD-L1 (7702) tanto en formato mono-específico bivalente parental (anti-CD137 o anti-PD-L1) como en formato biespecífico (anti-CD137xPD-L1) y comparamos estos anticuerpos con el anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9 y PF-05082566 y con un anticuerpo de control negativo (anticuerpo anti-RSV PG2708).

Para analizar el bloqueo del ligando CD137 bajo condiciones que son fisiológicamente relevantes, se probaron las IgG biespecíficas y mono-específicas en un ensayo de bloqueo del ligando huCD137 basado en células

utilizando citometría de flujo. En este ensayo, se esperaba que cantidades crecientes de anticuerpos que contenían un brazo anti-CD137 redujeran la cantidad de proteína recombinante huCD137L que se podía unir a células CHO-K1 que expresaban de forma estable huCD137. Con este fin, se incubaron células CHO(huCD137) con la proteína huCD137L junto con diluciones seriadas de cada anticuerpo. La unión de huCD137L se detectó con un anticuerpo secundario anti-huCD137L conjugado con biotina, seguido de una tinción con estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE).

Métodos

Se cosecharon las células CHO que expresaban de forma estable huCD137, se contaron y se diluyeron en tampón FACS a 5×10^5 células/ml y se agregaron 200 μ l (que contenían 1×10^5 células) a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U. Las células se mantuvieron en hielo. Las células se centrifugaron durante 3 minutos a 300 g a 4 °C y se lavaron al agregar 200 μ l de tampón FACS helado. Las células se centrifugaron de nuevo durante 3 min a 300 g a 4 °C y el sedimento se resuspendió en 25 μ l de dilución de anticuerpo en tampón FACS (diluciones en serie de 3 veces desde 25 hasta 0.034 μ g/ml) más 25 μ l de una solución de proteína huCD137L-FLAG (Adipogen # AG-40A-0198T; concentración final 0.06 μ g/ml). Las placas se incubaron durante 60 min en hielo y en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron dos veces al agregar 200 μ l de tampón FACS helado y centrifugando durante 3 min a 300 g a 4 °C. A continuación se agregaron 50 μ l/pocillo de anticuerpo policlonal de cabra huCD137L biotinilado (R&D Systems # BAF2295) diluido a 1 μ g/ml en tampón FACS helado. Las células se resuspendieron y las placas se incubaron durante 60 min en hielo en la oscuridad, seguido de dos lavados como anteriormente. A continuación se agregaron 50 μ l/pocillo de estreptavidina-PE diluida 1:200 en tampón FACS frío. Se resuspendieron las células y se incubaron las placas durante 30 minutos en hielo en la oscuridad, tras lo cual se lavaron dos veces como anteriormente. Las células se resuspendieron en 100 μ l de tampón FACS por pocillo y se fijaron mediante la adición de 100 μ l de solución de paraformaldehído (PFA) al 4 %. Las muestras se midieron utilizando un citómetro de flujo BD FACSCanto siguiendo las instrucciones de los manuales de BD. El grado de unión del ligando huCD137 se expresó como la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la estreptavidina-PE unida.

Resultados

Las curvas de unión obtenidas se muestran en la Figura 26. Como era de esperar, el control negativo no bloqueó la unión del ligando CD137. El bloqueo de la unión del ligando por los anticuerpos de control positivo difería: el anticuerpo de referencia PF-05082566 mostró un fuerte bloqueo, mientras que 20H4.9 mostró un bloqueo relativamente débil e incompleto. De los tres anticuerpos monoespecíficos anti-CD137, PG6785 fue el mejor bloqueador y PG6797 (pariente de PB17311) fue el segundo mejor. Los tres anticuerpos anti-CD137 x anti-PD-L1 biespecíficos correspondientes también fueron capaces de bloquear la unión del ligando CD137. Dado que se trata de un ensayo basado en células, estos resultados son indicativos de condiciones fisiológicamente relevantes.

Ensayo indicador PD-1/PD-L1

Otra etapa en la caracterización de los anticuerpos anti-CD137xPD-L1 candidatos fue determinar si podían bloquear la ruta PD-1/PD-L1, y comparar esto con la actividad de un anticuerpo de control específico para PD-L1. Esta actividad de bloqueo se comprobó *in vitro* en un ensayo indicador de bloqueo de PD-1/PD-L1 fisiológicamente relevante desarrollado por Promega basado en un sistema de dos células: Células CHO que expresan PD-L1 y un activador del receptor de células T, y una estirpe celular indicadora Jurkat/NFAT-RE que sobreexpresa PD-1. Las células T Jurkat contienen un gen indicador de luciferasa que se puede activar a través de la ruta NFAT (factor nuclear de células T activadas). La interacción de PD-1 con PD-L1 inhibe la activación de esta ruta. Sin embargo, el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 con anticuerpos contra PD-1 o PD-L1 puede activar la ruta NFAT. Por tanto, cuanto mayor sea el grado de bloqueo PD-1/PD-L1, mayor será la activación del gen indicador de la luciferasa. Con este fin, se agregaron diluciones seriadas de cada anticuerpo a células CHO que expresaban PD-L1 antes de la adición de células indicadoras Jurkat/NFAT-RE que sobreexpresaban PD-1. En la Figura 27 se muestra el grado de bloqueo después de 24 horas expresado como inducción de pliegues del gen informador, con la unión de las IgG biespecíficas de la izquierda y la unión de la IgG monoespecífica anti-PD-L1 a la derecha. De nuevo, el anticuerpo parental bivalente 7702 fue más potente que el anticuerpo de referencia de control positivo YW243.55.570. Todas las IgG biespecíficas presentaron niveles buenos y similares de actividad bloqueante.

Ejemplo 8

Efecto del nivel de expresión de PD-L1 en la transactivación de CD137 por biespecíficos CD137xPD-L1

Cultivo de estirpes celulares

Las células MDA-MB231 (No. de cat. CRM-HTB-26) se adquirieron de ATCC y se mantuvieron rutinariamente en DMEM con alto contenido en glucosa (Gibco) suplementado con piruvato de sodio 100 mM (Gibco) aminoácidos no esenciales MEM (Gibco) y FBS al 10 % (Lonza). Las células BxPC-3 (No. de cat. CRL-1687)

se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron de forma rutinaria en RPMI-1640 (Gibco) suplementado con un FBS al 10 % (Lonza).

Modo de acción de los anticuerpos CD137xPD-L1

Se utilizó el ensayo de transactivación del indicador Jurkat CD137-luc para determinar si la transactivación mediada por el anticuerpo CD137xPD-L1 se produciría a niveles fisiológicos de expresión de PD-L1 y si se correlaciona con los niveles de expresión de PD-L1. Por lo tanto, se determinó el número de sitios de unión a PD-L1 en varias estirpes celulares CHO-PD-L1 y estirpes de células tumorales humanas mediante análisis QIFIKIT (DAKO). Se seleccionaron tres estirpes celulares CHO-PD-L1 que mostraban niveles de expresión de PD-L1 correspondientes a estirpes de células tumorales humanas que expresaban niveles relativamente altos (células ES-2) intermedios (MDA-MB231) o bajos (BxPC-3) de PD-L1. La Figura 28A muestra un ejemplo de tres anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 en el uso de las tres estirpes celulares CHO seleccionadas que expresan ~6,000 a ~72,000 sitios de unión a PD-L1 por célula. Los datos muestran que los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 muestran una alta activación cuando hay más de 3.8×10^4 copias de PD-L1 presentes en la célula. A niveles bajos de PD-L1; en presencia de células CHO que expresan sólo ~6000 sitios de unión a PD-L1 por célula se observa un bajo nivel de activación. Por lo tanto, la transactivación por anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 se producirá en las proximidades de células que expresan altos niveles de PD-L1 tal como ocurre en un microambiente tumoral inmunosupresor, y por lo tanto proporciona una ventana terapéutica óptima para el anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1.

La Figura 28A muestra una correlación positiva entre la activación de NF-kB mediada por anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 y los niveles de expresión de PD-L1 en células CHO para todos los anticuerpos probados.

La Figura 28B muestra un ejemplo del ensayo de transactivación del indicador Jurkat CD137-luc en el que las células CHO-PD-L1 se sustituyeron por las estirpes celulares tumorales humanas que expresaban niveles superficiales de PD-L1 altos, intermedios y bajos. Este experimento confirmó que la transactivación mediada por el anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 está asociada con los niveles de expresión de PD-L1 de las células accesorias, y que los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 son capaces de transactivación en presencia de células tumorales que expresan altos niveles de PD-L1.

A continuación, se evaluó si la transactivación de CD137 en presencia de células accesorias que expresan PD-L1 era un rasgo específico de los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1. La Fig. 28C muestra un ejemplo en el que se evaluó la transactivación de células indicadoras Jurkat CD137-luc en presencia de células accesorias que expresan PD-L1 para anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1, sus bivalentes monoespecíficos parentales (CD137xCD137) y sus anticuerpos monoespecíficos monovalentes parentales CD137 (CD137xTT) y PD-L1 (TTxPD-L1). Todas las IgG se ensayaron a 10 µg/ml. Los datos muestran que sólo los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 mediaron la transactivación en presencia de células CHO o ES-2 que expresaban PD-L1. Como era de esperar, el anticuerpo de control de referencia 20H4.9 activó directamente las células indicadoras Jurkat CD137-luc y fue independiente de la expresión de PD-L1 por las células accesorias.

Ejemplo 9

Ensayo de transactivación CHO-PD-L1 x células T

Para determinar el valor agregado de utilizar una IgG biespecífica, evaluamos la capacidad de varios anticuerpos anti-CD137xPD-L1 biespecíficos para inducir la liberación de citocinas por células T en un ensayo de transactivación, y comparamos su activación con la de anticuerpos bivalentes de referencia contra PD-L1 (YW243.55.S70) y CD137 (20H4.9). Estos anticuerpos de referencia se probaron solos y en combinación equimolar. Con este fin, células T purificadas y activadas de un único donante sano se coinubaron durante 3 días con células CHO-PD-L1 y una dilución en serie de los anticuerpos de prueba (véase también el Ejemplo 4 para una descripción detallada de este ensayo). Posteriormente se midieron los niveles de IL-2, IFN γ y TNF α en sobrenadantes de cultivo sin diluir. En la Figura 29 se muestra el grado de liberación de citocinas medido en este ensayo de transactivación. Como se muestra en la Figura 29, los tres anticuerpos biespecíficos fueron más potentes para inducir la liberación de citocinas que cualquiera de los anticuerpos de referencia. Es importante destacar que cada uno de los tres anticuerpos biespecíficos también fue más potente en la inducción de la liberación de citocinas que una combinación de los dos anticuerpos de referencia, lo que demuestra sus características superiores de activación de células T.

Liberación de citocinas durante el ensayo de transactivación de células T

Para determinar el valor agregado de utilizar una IgG biespecífica, comparamos uno de los anticuerpos biespecíficos (PB17311; 6797 X 7702) con una mezcla de sus IgG parentales monoespecíficos bivalentes y con anticuerpos bivalentes de referencia contra PD-L1 y CD137, en términos de su capacidad para activar la liberación de citocinas por células T en un ensayo de transactivación. Estos anticuerpos de referencia se basan en anticuerpos terapéuticos utilizados en la clínica: el clon anti-PD-L1 YW243.55.S70 se basa en

Atezolizumab, el clon anti-CD137 20H4.9 se basa en Urelumab y el clon anti-CD137 PF-05082566 se basa en Utomilumab. Estos anticuerpos de referencia se probaron solos y en combinación equimolar.

En estos experimentos, los anticuerpos fueron probados en una titulación de 10 veces en 6 etapas comenzando en 20 µg/ml. Se descongelaron PBMC de 2 donantes y se agregaron 9 volúmenes de medio de cultivo (RPMI1640 con L-glutamina y FBS inactivado por calor al 10 %). Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 150 g a T.A. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo y se dejó reposar a las células al incubarlo durante la noche en un tubo falcon de 50 ml a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa. Como preparación para el ensayo de transactivación, los pocillos interiores de una placa de 96 pocillos (Cellstar, No. de cat. 655180) se recubrieron durante la noche con 5 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 (clon OKT3) en PBS.

Al día siguiente, se aislaron linfocitos T utilizando el procedimiento de purificación de enriquecimiento de célula T Easy Sep (pan CD3) como se describe por el fabricante (Stem cell Technologies, No. de cat. 19051). El procedimiento EasySep utiliza selección negativa. Brevemente, las PBMC se centrifugaron durante 10 minutos a 150 g a T.A. El sedimento celular se resuspendió en 2 ml de PBS + FBS al 2 % con EDTA 1 mM. La suspensión celular se filtró a través de un colador de nailon de malla de 30 µm. Se contaron las células y se reajustaron a 5×10^7 células/ml en PBS + FBS al 2 % con EDTA 1 mM. Se agregaron 50 µl de Cóctel de Enriquecimiento de Células T Humanas EasySep a cada volumen de células de 2 ml, se mezclaron y se dejaron incubar durante 10 minutos a T.A. A continuación, se agregaron 50 µl de Partículas Magnéticas EasySep D a cada volumen de células de 2 ml y se dejaron incubar durante 5 minutos a T.amb. El volumen total se llevó a 2.5 ml con PBS + FBS al 2 % con EDTA 1 mM. A continuación, se colocó el tubo en el imán y se dejó que la fracción celular no deseada se uniera al imán durante 5 minutos a T.A. A continuación, se invirtió el tubo y la fracción purificada de células T se vertió en un nuevo tubo, las células se cosecharon por centrifugación durante 10 minutos a 150 g a T.A. y posteriormente se resuspendieron a una concentración de 10^6 células/ml en medio de cultivo.

El mismo día, las placas de 96 pocillos previamente recubiertas se lavaron con PBS y se agregaron 25 µl del anticuerpo prediluido, seguido de 50 µl de células T purificadas (50,000 células/pocillo) y 25 µl de células CHO-PD-L1 (30,000 células/pocillo). Se dejaron incubar las células durante 72 horas a 37 °C. A continuación se recolectó el sobrenadante y se analizó fresco o se almacenó a -80 °C. Los niveles de citocinas se midieron en sobrenadantes de cultivo sin diluir mediante el ensayo Luminex Multiplex siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron mediante el software de análisis eBioscience.

Para un subconjunto de 16 citocinas, los niveles inducidos por PB17311 en el ensayo de transactivación fueron superiores a los inducidos por el anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9 solo o en combinación con el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.S70 (véase la Figura 30). El subconjunto estaba compuesto por GM-CSF, IL-2, IL-13, IFN γ , TNF β , IL-17A, TNF α , IL-18, IL-1 α , IL-22, IL-4, IL-31, IL-6, IL-5, IL-21 e IL-9. El mayor aumento de los niveles de citocinas inducido por PB17311 se observó en GM-CSF, IL-2, IL-13, IL-17A, IFN γ , TNF- α , TNF- β , IL-18, IL-22, e IL-4. No se observó una liberación notable de citocinas mediada por anticuerpos para IL-1 β , IL-1RA, IL-7, IL-10, IL-12p70, IL-15, IL-23, o IL-27. No se observó un aumento de la liberación de citocinas cuando las células se incubaron únicamente con el anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S70, o únicamente con el anticuerpo anti-CD137 PF-05082566, o con los anticuerpos bivalentes parentales 6797 (CD137) o PD-L1 (7702).

En conclusión, este experimento muestra que el anticuerpo biespecífico PB17311 tiene una capacidad de activación de células T mejorada en comparación con el anticuerpo anti-CD137 de referencia 20H4.9 solo o en combinación con el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.570.

Una ventaja importante de PB17311 es que este anticuerpo biespecífico es más potente en la activación de células T que una mezcla de dos anticuerpos de referencia.

Ejemplo 10

Ensayo SEB

Para caracterizar aún más los tres anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 PB17309, PB17310 y PB17311, se determinó su capacidad para mejorar la liberación de citocinas por PBMC en presencia de enterotoxina estafilocócica B (SEB). Con este fin, se incubaron PBMC purificadas de 3 donantes durante 3 días en presencia de SEB (2000 o 125 ng/ml) y una dilución en serie de los tres anticuerpos biespecíficos candidatos o anticuerpos de control. El anticuerpo de control de referencia en este experimento fue el anticuerpo anti-CTLA4 10D1 que ha demostrado inducir una potente liberación de citocinas en este ensayo.

Los niveles de citocinas se midieron en los sobrenadantes de cultivo mediante el ensayo Luminex Multiplex. En la Figura 31 se muestran los resultados de la liberación de IL-2 por PBMCs de tres donantes diferentes a las dos concentraciones diferentes de SEB. Esta comparación demuestra que los perfiles de actividad de los 3 anticuerpos bivalentes CD137xPD-L1 fueron consistentes entre los tres donantes. También muestran que PB17309 y PB17311 fueron los más eficaces de los anticuerpos biespecíficos. Los tres PB17309 (6763x7702),

PB17310 (6785x7702) y PB17311 (6797x7702) fueron más potentes que los anticuerpos de control positivo. Los resultados de los niveles de IL-2, IFN γ y TNF α liberados por PBMC de un único donante (No. 1038) a una concentración de SEB de 2000 ng/ml se muestran en la Figura 32, en la que se comparó la liberación de citocinas inducida por los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 con la inducida por anticuerpos bivalentes de referencia contra CD137 (20H4.9) o PD-L1 (YW243.55.S70), solos o en una mezcla equimolar. Esta comparación demuestra que los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 son claramente más eficaces en la activación de PBMC que cada uno de los anticuerpos bivalentes de referencia. Es importante destacar que cada uno de los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 también fue más eficaz en la activación de PBMC que una mezcla de YW243.55.S70 y 20H4.9, lo que demuestra una vez más las características superiores de activación de células T de estos anticuerpos biespecíficos en presencia de células que expresan PD-L1 que pueden proporcionar activación en trans de las moléculas biespecíficas.

Ejemplo 11

Efecto de PB17309, PB17310 y PB17311 en la supresión mediada por macrófagos M2 de PBMC estimuladas con anti-CD3/CD28

Los macrófagos clásicamente activados (macrófagos M1) pueden destruir tumores durante las primeras etapas de la carcinogénesis. Sin embargo, durante la transición de la transformación temprana a estadios tumorales avanzados, los cambios dinámicos en el microambiente tumoral impulsan gradualmente el cambio de macrófagos M1 a M2. Los macrófagos M2 asociados a tumores secretan citocinas inmunosupresoras e inducen la supresión inmunitaria mediante la ligadura a PD-1. Como tales, los macrófagos M2 inhiben la proliferación de células T y la producción de citocinas.

Se ha utilizado un ensayo de supresión de macrófagos M2 desarrollado por Aquila Biomedical para demostrar que un anticuerpo anti-PD-1 puede revertir parcialmente el efecto inhibitorio de los macrófagos M2 sobre la proliferación de células T. Utilizamos este ensayo para probar el efecto de PB17309, PB17310 y PB17311 sobre la repolarización de macrófagos M2, utilizando la expresión de IFN- γ como lectura, y lo comparamos con los efectos mediados por un control de isotipo negativo (anticuerpo anti-RSV-G PG2708) y dos anticuerpos de referencia (anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9 y anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.570).

Ensayo de supresión M2

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre fresca recolectada de cinco voluntarios sanos. Se utilizó clasificación celular magnética para aislar monocitos mediante selección negativa (sin agotamiento de CD16). También se criopreservó un subconjunto de PBMC de cada uno de los 5 donantes para su uso posterior en el ensayo de cocultivo PBMC/M2. Los macrófagos M2 se generaron al cultivar monocitos aislados con M-CSF (50 ng/ml) en RPMI-10 (RPMI-1640, FBS inactivado por calor al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y L-glutamina 2 mM, β -mercaptoetanol 50 μ M) durante 8 días en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Durante el periodo de cultivo, las células se reponían con RPMI-10 fresco suplementado con M-CSF los días 3 y 6. El día 8 se retiraba el medio de cultivo. El día 8, se retiró el medio, se agregó medio fresco (sin M-CSF) y se activaron las células con LPS (0.1 μ g/ml) durante 2 horas. A continuación, se lavaron los macrófagos para eliminar el LPS y se repusieron con medio fresco (sin M-CSF). Los macrófagos M2 se cocultivaron con PBMC autólogas (descongeladas y lavadas) en una relación de 4:1 (PBMC:M2) en presencia o ausencia de anticuerpos de prueba o controles de isotipo (10 μ g/ml), por triplicado. Después de 24 horas de intercomunicación, los cultivos se estimularon con anti-CD3 (1 μ g/ml) y anti-CD28 (2 μ g/ml) durante tres días para activar las células T a través del complejo receptor TCR. A continuación, se midió el IFN- γ en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA con sobrenadantes diluidos 1:10 o 1:20 en el diluyente ELISA apropiado para obtener valores dentro del rango de detección de los kits. Se efectuaron análisis estadísticos entre la sustancia de prueba y los grupos de control apropiados utilizando una prueba t de proporciones emparejadas o un ANOVA unidireccional para comparaciones múltiples con la prueba de comparaciones múltiples post hoc de Dunnett (para comparaciones entre un control y varios grupos) o de Holm-Sidak (para comparaciones entre todos los grupos). Se asumió significación estadística cuando $P < 0.05$.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 33, con los datos presentados como los niveles medios de IFN- γ de los triplicados detectados por ELISA después de la estimulación anti-CD3/CD28 de PBMCs. De estos resultados se desprende claramente que las PBMC cultivadas en ausencia de macrófagos M2 produjeron mayores niveles de IFN- γ después de la estimulación con CD3 y CD28 (compárese la condición "Sólo PBMC" con la condición "Sin estimular"; * indica $P < 0.05$). A pesar de la heterogeneidad de los resultados obtenidos para los distintos donantes, se concluye que los tres anticuerpos biespecíficos aumentaron la producción de IFN- γ en los cocultivos M2:PBMC. Aunque no es estadísticamente significativo, PB17309 y PB17310 muestran una tendencia de aumento de la producción de IFN- γ en relación con los tratados con el control de isotipo PG2708. Es importante destacar que la adición de PB17311 aumentó significativamente la producción de IFN- γ en los cocultivos M2:PBMC en relación con los tratados con el control de isotipo PG2708 (** indica $P < 0.01$). Los resultados obtenidos con PB17309 y PB17310 son comparables a los obtenidos con el anticuerpo de

referencia anti-CD137 20H4.9 y con el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.570. Los resultados que se obtienen con PB17309 y PB17310 también son comparables a los obtenidos con una combinación de ambos anticuerpos de referencia.

Ejemplo 12

5 Efecto de PB17311 en el cebado de células T CD8⁺ humanas vírgenes

Los anticuerpos biespecíficos CD137 x PD-L1 de acuerdo con la presente invención inducen la activación de células T mediante el puenteo de CD137 en la célula T y PD-L1 en células accesorias. Se considera que esto da lugar a la señalización de CD137 y mejora la activación del TCR dependiente de antígeno mediante el bloqueo de la ruta PD-1/PD-L1. En presencia de tumores que expresan PD-L1, los anticuerpos biespecíficos CD137 x PD-L1 de acuerdo con la presente invención facilitan la (re)activación de células T específicas de antígeno, como se muestra en los Ejemplos actuales. Esto es coherente con el hecho de que se sabe que la coestimulación de CD137 permite la expansión, la producción de citocinas y la supervivencia de las células T (Bertram et al 2004). Sin embargo, también queríamos demostrar que los anticuerpos biespecíficos CD137 x PD-L1 de acuerdo con la presente invención facilitan respuestas de células T eficaces *de novo* contra neoantígenos tumorales. El cebado de células T CD8⁺ vírgenes en modelos de infección de ratones ha mostrado que la coestimulación con CD137 facilita la formación de poblaciones de células T efectoras y de memoria central (Zhao et al 2012). Por lo tanto, evaluamos los efectos mediados por uno de nuestros anticuerpos biespecíficos (PB17311; 6797 x 7702) en el cebado de células T CD8⁺ humanas vírgenes.

Debido al bajo número de células precursoras de células T vírgenes, el cebado antígeno-específico de células T humanas es difícil de evaluar. Sin embargo, se ha descubierto que un antígeno sobreexpresado en el melanoma -el antígeno asociado al tumor Melan-A- es particularmente adecuado para evaluar las respuestas de células T vírgenes en células T humanas. Esto se debe a que los niveles de células T específicas para este epítipo peptídico Melan-A 27-35 restringido por HLA-A0201 son unas 10 veces mayores que los niveles de células T frente a otros antígenos propios o asociados a tumores; el epítipo es reconocido por aproximadamente 1 de cada 1000 células T vírgenes. En base a este epítipo, Wölfl y Greenberg (2014) han desarrollado un sistema de cebado *in vitro* que evalúa de forma fiable las condiciones de cebado de las células T CD8⁺. El método se conoce como activación específica de antígeno y cebado de células T CD8 humanas, o ASAP-T8. En un ensayo ASAP-T8, las células T CD8⁺ vírgenes aisladas se cocultivan con células dendríticas autólogas derivadas de monocitos cargadas con antígenos peptídicos durante 10 días, seguido de un análisis cuantitativo y cualitativo de las células T específicas de antígeno.

En este Ejemplo el ensayo ASAP-T8 se realizó de acuerdo con los métodos detallados descritos en Wölfl y Greenberg (2014) utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de dos donantes independientes (no. 1064 y 1066). Los anticuerpos y controles probados en el ensayo fueron el anticuerpo anti-CD137xPD-L1 PB17311, el anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9, el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.570, una mezcla equimolar de ambos anticuerpos de referencia y el anticuerpo de control negativo anti-RSV-G PG2708. Los anticuerpos de prueba se agregaron desde el inicio del cultivo de células DC:T y de nuevo durante la primera alimentación.

Generación de células dendríticas maduras derivadas de monocitos (mDC)

Las células dendríticas maduras derivadas de monocitos se generaron utilizando un protocolo que seguía los métodos detallados descritos en Wölfl y Greenberg (2014). Con este fin, cuatro días antes del inicio del ensayo ASAP-T8, se descongelaron PBMC de donantes HLA-A2⁺, se centrifugaron a 300 g durante 5 min a T.A. y se resuspendieron en medio de cultivo (Medio de Células Dendríticas CellGro (CellGenix, No. de cat. 2005) + suero humano al 1 %) hasta 1×10^7 /ml. A continuación, se agregaron 2 ml de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Después de una incubación de 2-3 horas a 37 °C para permitir la adherencia al plástico, se retiró el medio y se eliminaron las células no adherentes a través de lavado con PBS. Se agregaron a cada pocillo 3 ml de medio de cultivo caliente suplementado con 10 ng/ml de IL-4 y 1600 UI/ml de GM-CSF, y se incubaron durante 2 días a 37 °C. Después de la adición de 1.5 ml de medio de cultivo fresco suplementado con IL-4 y GM-CSF, se incubaron las células durante 24 horas más.

Las DC inmaduras se cosecharon mediante la eliminación de 3 ml de sobrenadante seguido de una resuspensión vigorosa de las células en el medio restante, y lavado con PBS frío para eliminar cualquier célula restante. Se agruparon y contaron las células y se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a T.A. El sedimento se resuspendió a 1×10^6 células/ml en medio de cultivo precalentado, suplementado con GM-CSF (800 UI/ml), IL-4 (10 ng/ml), LPS (10 ng/ml) e IFN γ (100 UI/ml). Se agregaron 2 ml de suspensión celular (2×10^6 células) a los pocillos de una nueva placa de 6 pocillos. El péptido antígeno de Melan-A (JPT, No. de cat. SP-MHCI-0006) disuelto en DMSO a 5 μ g/ μ l se agregó a los pocillos correspondientes a 2.5 μ g/ml y las células se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

Después de comprobar la morfología de las CD, se cosecharon las CDM a través de resuspensión vigorosa con una pipeta y enjuagando los pocillos vacíos con PBS helado para asegurar la eliminación de todas las

células adherentes. Las CDM que habían sido pulsadas con péptido y las que no lo habían sido se agruparon por separado y se contaron las células vivas. Los tubos con mDC se mantuvieron en hielo en todo momento y se irradiaron con 30 Gy (3000 Rad) para evitar la posible proliferación de células contaminantes durante el posterior cocultivo prolongado de las células. A continuación, las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a T.A., y se resuspendieron en medio DC CellGro + suero humano al 5 % (HS) a 5×10^5 células/ml.

Generación de células T CD8 vírgenes

Un día antes del inicio del ensayo ASAP-T8, se descongelaron PBMC de los mismos donantes HLA-A2* que los utilizados para generar mDC, se centrifugaron a 300 g durante 5 min a T.amb. y se resuspendieron en tampón PBS/HS/EDTA frío (PBS con un HS al 2 % y EDTA 1 mM) a 5×10^7 células/ml. Las células se utilizaron para el aislamiento de células T CD8+ vírgenes utilizando el Kit de Aislamiento de Células T CD8+ Vírgenes Humanas EasySEP (STEMCELL, No. de cat. 19258).

Se agregaron 50 µl de Cóctel de Aislamiento EasySep por ml de muestra celular, luego se mezcló y se incubó a T.A. durante 10 minutos. A continuación, se agitaron en vórtex las partículas magnéticas EasySep durante 30 segundos y se agregaron 100 µl de partículas por ml de muestra para eliminar las células no deseadas. Después de incubación a temperatura ambiente durante 10 min, la suspensión celular se completó hasta un volumen total de 2.5 ml mediante adición de tampón EasySep, y las células se mezclaron mediante pipeteo suave seguido de transferencia a un tubo Falcon de 5 ml. Se retiró el tapón y se colocó el tubo en el imán EasySep. Después de 5 minutos a T.A., la fracción deseada se vertió en un nuevo tubo Falcon de 5 ml al invertir el imán y el tubo en un movimiento continuo, dejando las células no deseadas marcadas magnéticamente dentro del tubo original. El imán y el tubo se dejaron en posición invertida durante 3 segundos antes de volver a la posición vertical, dejando las gotas que quedaban colgando de la boca del tubo. El tubo viejo con células no deseadas se retiró del imán y el tubo nuevo con la fracción celular enriquecida negativamente se colocó en el imán para una segunda separación. Después de 5 minutos a T.A., se vertió la fracción deseada de la misma manera.

Las células enriquecidas seleccionadas negativamente fueron contadas y luego centrifugadas a 300 g durante 5 min a T.A. y resuspendidas a una concentración celular final de 3×10^6 células/ml en medio de cultivo CellGro DC suplementado con HS al 5 %, y conteniendo 5 ng/ml IL-7 para permitir un cebado óptimo de células T. Las células se transfirieron a placas de 6 pocillos a razón de 2 ml/pocillo y se incubaron durante la noche.

Ensayo ASAP-T8

Este ensayo se realizó por triplicado para cada donante, siguiendo los métodos detallados descritos en Wölfl y Greenberg (2014). Las células T que se habían preincubado con IL-7 se cosecharon, agruparon y contaron, y después se centrifugaron a 300 g durante 5 min a T.A. El sedimento se resuspendió en medio de cultivo a 2×10^6 células/ml y se agregó IL-21 a 60 ng/ml para mejorar el cebado de células T CD8+. Se prepararon dos mezclas de células DC/T al mezclar mDC pulsado con péptido o DC no pulsado con células T en una relación de 1:1 v/v, lo que dio como resultado una relación de células T:DC de 4:1 y una concentración final de IL-21 de 30 ng/ml. Los anticuerpos de prueba se agregaron a una concentración final de 10 µg/ml. A continuación, se transfirieron 500 µl de cada mezcla celular a pocillos individuales de placas de 48 pocillos.

Las células se cocultivaron a 37 °C durante un total de 10 días, lo que implicó dos etapas de alimentación y una transferencia a placas frescas. Las células se alimentaron primero después de 72 h con 500 µl adicionales de medio de cultivo caliente que contenía HS al 5 % y 10 ng/ml de IL-15 y 10 ng/ml de IL-7 (concentración final de citocinas 5 ng/ml) en presencia o ausencia de 20 µg/ml de anticuerpo de prueba (concentración final de IgG 10 µg/ml) y se incubaron durante 48 horas. Para dejar más espacio para la expansión y reducir el número de células mieloides residuales (plastiadherentes) de la preparación de DC, las células y el medio se transfirieron entonces a pocillos nuevos de una placa de 24 pocillos, a los que ya se había agregado 1 ml de medio que contenía un HS al 5 % y 10 ng/ml de IL-15 e IL-7. Después de una incubación adicional de 120 hora horas de incubación las células estaban listas para el análisis.

En el día 10 de cocultivo, las células de pozos individuales se cosecharon y contaron para determinar los recuentos celulares absolutos por pozo. A continuación, las células T se tiñeron con un dextrámero específico de Melan-A marcado con fluorescencia (Immudex, No. de cat. WB2162-APC). En este dextrámero, la estructura principal de polímero de dextrano lleva >10 complejos MHC-péptido y moléculas de fluorocromo (aloficocianina), permitiendo de esta manera la detección de células T CD8+ específicas del péptido Melan-A mediante análisis FACS. Las células también se tiñeron con otros anticuerpos contra marcadores de subconjuntos específicos de células T. Con este fin, las células derivadas de pocillos individuales se transfirieron a pocillos de una placa FACS de 96 pocillos a 50,000 células/pocillo. Las células se centrifugaron durante 5 min a 300 g, se eliminó el sobrenadante y, seguido por la adición de 40 µl de dextrámero (dilución 1:50 en PBS + FBS al 5 %) y se incubaron en la oscuridad durante 20 min a T.A. A continuación se agregaron anticuerpos adicionales específicos para CD8, CD45RA y CCR7 (5 veces concentrados) en 10 µl de tampón FACS. Las células se incubaron en la oscuridad durante 20 min a 4 °C y luego se lavaron dos veces con tampón FACS. Después de la incubación durante 10 min a 4 °C, las células estaban listas para el análisis por FACS.

Resultados

Expansión de células T

La población dextrámero-positiva representa células específicas de antígeno que se habían expandido tras el cebado y constituían el 5-24 % de la población total de células T CD8. El tamaño relativo de la población de células T CD8 positivas al dextrámero y los números absolutos de células se utilizaron para calcular el número de células T CD8+ específicas de antígeno por pocillo y los datos de cada donante se expresaron como el número de células T CD8+ específicas de antígeno en cultivo en relación con la muestra que no contenía anticuerpo (véase la Figura 34). Los datos mostrados proceden de un experimento realizado por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar.

De estos resultados se desprende claramente que la población de células T CD8+ específicas de antígeno positivas a dextrámero se expandió cuando el antígeno peptídico estuvo presente durante el cebado (compare las condiciones "Sin ctrl de péptido" y "Sin Ab" en la Figura 34).

El anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9 mejoró la expansión de células T CD8+ específicas de antígeno en relación con el anticuerpo de control negativo, pero sólo en un donante (PBMC1064).

El anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.S70 no afectó la expansión.

El anticuerpo CD137xPD-L1 PB17311 aumentó significativamente la expansión de células T CD8+ específicas de antígeno en ambos donantes en relación con el anticuerpo de control negativo. PB17311 mejoró la expansión de células T CD8+ específicas de antígeno en mayor medida que el anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9. PB17311 tuvo una mayor actividad de expansión de células T CD8+ en comparación con una combinación del anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S70 y el anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9. Esto significa que este anticuerpo biespecífico CD137 x CD137 es más potente en el cebado de células T CD8+ vírgenes que los anticuerpos de referencia específicos de CD137 y específicos de PD-L1.

Diferenciación de células T

Tras el cebado específico de antígeno, las células T vírgenes comienzan a diferenciarse. Durante este proceso de diferenciación, la expresión de CCR7 y CD45RA sobre la superficie de las células se regula a la baja, reexpresándose CD45RA en células T efectoras diferenciadas terminalmente. Por lo tanto, la regulación a la baja de la expresión de CCR7 y CD45RA es un indicio de diferenciación. La expresión de los marcadores de diferenciación CCR7 y CD45RA se analizó al separar las células CD8+dextrámero+ y determinar a continuación el número relativo de células dentro de los diferentes subconjuntos de células T. Los subconjuntos se definieron como células madre T vírgenes/con memoria (T_N/T_{SCM}): CD45RA+CCR7+; células T de memoria central (T_{CM}): CD45RA-CCR7+; células T de memoria efectoras (T_{EM}): CD45RA-CCR7-; y células T efectoras terminalmente diferenciadas (T_{TE}): CD45RA+CCR7-. Los datos de cada donante se expresaron como el porcentaje de cada subconjunto de células T dentro de la población de células T CD8+dextrámero+ (véase la Figura 35). El anticuerpo CD137xPD-L1 PB17311 mejoró la diferenciación de las células T CD8+ específicas de antígeno en ambos donantes en relación con el anticuerpo de control negativo. Cuando comparamos las células T que habían sido cebadas en presencia del anticuerpo de control negativo y las cebadas en presencia del anticuerpo, encontramos que PB17311 reducía los números relativos de células T CD8+ específicas de antígeno con un fenotipo celular virgen (T_N/T_{SCM}) y aumentaba los números relativos de las poblaciones de células efectoras de memoria y diferenciadas terminalmente (T_{EM} y T_{TE} en la Figura 35). PB17311 mejoró la diferenciación de células T CD8+ específicas de antígeno en mayor medida que el anticuerpo de referencia 20H4.9, como muestra el aumento de los números relativos de las poblaciones de células efectoras de memoria y diferenciadas terminalmente dentro de la población de células T CD8+ incubadas con PB17311 en comparación con la población de células T CD8+ incubadas con 20H4.9. PB17311 incluso mejoró la diferenciación de células T CD8+ específicas de antígeno en mayor medida que la combinación del anticuerpo anti-PD-L1 YW243.55.S70 y el anticuerpo de referencia 20H4.9 anti-CD137. Esto significa que este anticuerpo biespecífico CD137 x PD-L1 es más potente a la hora de mejorar la diferenciación de células T vírgenes tras el cebado que los anticuerpos de referencia específicos de CD137 y específicos de PD-L1.

Sin estar limitado a ninguna teoría, se considera que los potentes efectos del anticuerpo CD137xPD-L1 PB17311 en el cebado de células T CD8+ depende principalmente de la inducción de la señalización CD137 en células T. Al unirse a CD137 expresado en la superficie de las células T después del reconocimiento del antígeno y a PD-L1 en las CD maduras, PB17311 permite la agrupación de receptores CD137 necesaria para la señalización de CD137.

En resumen, estos resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico CD137/PD-L1 PB17311 mejora tanto la expansión como la diferenciación de células T CD8+ vírgenes *in vitro*.

PB17311 tiene un mayor potencial de expansión y diferenciación en comparación con (una combinación de) el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.S70 y el anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9. Esto

demuestra que PB17311 es más eficaz para inducir o mejorar nuevas respuestas de células T contra tumores existentes.

Ejemplo 13

Efecto de PB17311 sobre CD107a y la expresión de citocinas por las células T

- 5 Como se demostró en el Ejemplo 10, los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 pueden mejorar la producción de IL-2, TNF α e IFN γ en el sobrenadante de PBMC activadas con SEB. En el presente documento utilizamos tinción intracelular de citocinas y análisis FACS para identificar los subconjuntos de células T responsables de la mejora de la producción de citocinas tras el tratamiento con el anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 PB17311. También evaluamos la expresión de CD107a como marcador de la citotoxicidad de las células T
- 10 CD8+. Comparamos el efecto de PB17311 con el del anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9, el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.570, una mezcla equimolar de ambos anticuerpos de referencia y el anticuerpo de control negativo anti-RSV-G PG2708.

- 15 Para este fin, las PBMC se estimularon con SEB (320 ng/ml) en la presencia o ausencia de anticuerpos por 24 hrs, y se tiñeron para los marcadores CD3, CD4, CD8, CCR7, CD45RO y CD107a, para las citocinas IL-2, IFN γ y TNF α , y utilizando un tinte de viabilidad. Las PBMC cultivadas en ausencia de SEB y anticuerpos se incluyeron como control de la estimulación con SEB (Sin estimular). Se analizó la expresión de CD107a y citocinas en la población total de células T (células CD3+) y en los siguientes subconjuntos de células T CD4 y CD8: células T vírgenes (CD45RO-CCR7+), células T de memoria central (CD45RO+CCR7+), células T de memoria efectoras (CD45RO+CCR7-) y células T efectoras diferenciadas terminalmente (CD45RO-CCR7-). Los
- 20 resultados sólo se muestran para los subconjuntos en los que se observaron las diferencias más pronunciadas: Células CD4 efectoras de memoria (EM), células CD8 EM y células CD8 efectoras diferenciadas terminalmente (TE).

Métodos

Lista de anticuerpos utilizados para detectar dianas intracelulares y extracelulares en el análisis FACS.

Diana	Conjugado	Proveedor	No. de cat.
CCR7	BV605	Biolegend	353224
CD45RO	BV785	Biolegend	304234
CD3	APC-H7	BD	560176
CD4	PerCP/Cy5.5	BD	560650
CD8	FITC	BD	555634
IFN γ	BV421	BD	562988
IL-2	PE	eBioscience	12-7029-42
TNF α	Pe-Cy7	Biolegend	502930
CD107a*	AF647	Biolegend	328612
* agregado a las células durante la estimulación SEB			

25

- Las PBMC criopreservadas derivadas de un único donante sano fueron descongeladas y dejadas en reposo durante la noche. A continuación, se contaron las células, se centrifugaron a 200 g durante 12 minutos y el sedimento se resuspendió a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio PBMC (RPMI1640, FBS inactivado por calor al 10 % y 1 Penicilina-Estreptomicina). Se agregaron 100 μ l de suspensión celular a los pocillos de dos placas de 96 pocillos de fondo redondo a las que ya se habían agregado 100 μ l de medio PBMC
- 30 que contenía SEB y anticuerpo de prueba. La concentración final de SEB fue de 320 ng/ml. Cada anticuerpo se probó por triplicado a una concentración única de 1 μ g/ml (excepto la combinación de YW243.55.570 y 20H4.9 que se probó a 0.5+0.5 μ g/ml). También se incluyeron pocillos de control sin SEB ni anticuerpos. La estimulación se realizó durante 24 horas a 37 °C, 5 % de CO₂, 95 % de humedad. Durante las últimas 12 horas
- 35 de incubación se agregó a cada pocillo anti-CD107a y una mezcla de Brefeldina A (Golgiplug, BD) y Monensina (Golgi-stop, BD).

A continuación, se agruparon placas duplicadas y las PBMC se tiñeron con anticuerpos específicos para los marcadores y citocinas relevantes (resumen proporcionado en la lista de anticuerpos anterior). Dado que la

detección de CD3, CD4 y CD8 no se ve comprometida después de la fijación, se agregaron anticuerpos contra estas dianas en la etapa de tinción intracelular, junto con anticuerpos contra las citocinas intracelulares. Debido a su conocida sensibilidad a la fijación, las dianas extracelulares CCR7 y CD45RO se tiñeron antes de la etapa de fijación. Con este fin, se centrifugaron las placas a 350 g durante 3 minutos, se resuspendieron las células en 100 µl de PBS por pocillo y se agruparon las células de las placas duplicadas. Las placas se centrifugaron como antes y las células se resuspendieron en 100 µl por pocillo de Colorante de Viabilidad Fijable diluido 1:1000 (eBioscience, No. de cat. 65-0866). Después de una incubación de 10 minutos a T.A. en la oscuridad, se agregaron 150 µl de tampón FACS (PBS pH 7.4, BSA al 0.5 %, EDTA 0.5 mM) a cada pocillo. Las placas se centrifugaron y las células se resuspendieron en 25 µl de anticuerpo anti-CCR7 diluido en tampón FACS. Después de una incubación de 15 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂, 95 % de humedad, se agregaron 25 µl de anticuerpo anti-CD45RO diluido en tampón FACS. Después de 30 minutos de incubación a T.A. en la oscuridad, se agregaron 150 µl de tampón FACS a cada pocillo. Las placas se centrifugaron como antes y las células se resuspendieron en 200 µl de tampón FACS. Las placas se centrifugaron y las células se resuspendieron en 100 µl de solución de fijación/permeabilización de BD (BD Biosciences, No. de cat. 554714). Después de una incubación de 10 min a T.A. en la oscuridad, se agregaron 100 µl de tampón BD Perm/Wash (BD Biosciences, No. de cat. 554714). A continuación, se centrifugaron las placas a 350 g durante 3 minutos y se resuspendieron las células en 200 µl de tampón BD Perm/Wash.

Después de esta etapa de fijación y permeabilización, las placas se centrifugaron a 500 g durante 3 min y las células se resuspendieron en 50 µl de una solución de tampón BD Perm/Wash que contenía anticuerpos específicos para dianas intracelulares. Esta solución contenía anticuerpos contra las dianas intracelulares IFN γ , IL-2 y TNF α , y contra CD3, CD4 y CD8. Las placas se incubaron durante 1 hora a T.A. en la oscuridad y a continuación se agregaron 150 µl de tampón BD Perm/Wash a cada pocillo. A continuación, se centrifugaron las placas a 350 g durante 3 min y se resuspendieron las células en 200 µl de tampón BD Perm/Wash. Las placas se centrifugaron de nuevo a 350 g durante 3 min, las células se resuspendieron en 100 µl de solución fijadora (PBS pH 7.4, BSA al 0.5 %, EDTA 0.5 mM, formaldehído al 1 %) y se almacenaron a 4 °C hasta su adquisición al día siguiente.

Las muestras se midieron utilizando un citómetro de flujo BD Fortessa y los datos se analizaron utilizando el software FlowJo versión 10. Las poblaciones celulares se analizaron de la siguiente manera: los singletes se discriminaron de los dobletes al graficar FSC-A frente a FSC-H. Las células muertas se excluyeron al separar la población negativa para la tinción de viabilidad. Las células T se identificaron como CD3+ y se dividieron en subconjuntos CD4+ y CD8+. Estos subconjuntos de células T se dividieron a su vez en células vírgenes, de memoria central, de memoria efectoras y efectoras terminalmente diferenciadas, en base a la expresión de CCR7 y CD45RO. La expresión de citocinas y CD107a se evaluó dentro de la población total de células T y dentro de las subpoblaciones y se expresó como porcentaje de la población total de células T.

Resultados

Los niveles intracelulares de CD107a, IFN γ , IL-2 y TNF α en la población total de células T se muestran en la Figura 36, con los niveles expresados por los tres subconjuntos individuales de células T (CD4 T_{EM}, CD8 T_{EM} y CD8 T_{TE}) mostrados en la Figura 37. En estas figuras, las líneas de puntos representan el porcentaje medio de células positivas para el marcador indicado cuando se estimula con SEB y el anticuerpo de control negativo PG2708. Las barras representan los valores medios $\pm$ DE de un experimento realizado por triplicado utilizando células derivadas de un único donante. Para probar las diferencias significativas, cada condición se comparó con el anticuerpo de control negativo PG2708 (Ab Ctrl Neg.) mediante ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los valores de p se indican con asteriscos como sigue: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

En relación con el anticuerpo de control negativo, PB17311 mejoró la producción de CD107a, IL-2 e IFN γ en la población total de células T (Figura 36). Cabe destacar que, la producción de CD107a mejoró más con PB17311 en comparación con el anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9, el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.570, y también en comparación con una mezcla equimolar de ambos anticuerpos de referencia. De esto se concluye que la citotoxicidad de las células T CD8+ mejora más después de la incubación con PB17311 en comparación con 20H4.9, YW243.55.570 o una mezcla de los mismos. La producción de IL-2 e IFN γ también parece ser mayor después de la incubación con PB17311 en comparación con 20H4.9 e YW243.55.570.

Cuando observamos con más detalle los subconjuntos individuales de células T, descubrimos que PB17311 mejoraba la expresión de las tres citocinas en las células CD4 T_{EM}. PB17311 también aumentó la expresión de CD107a en las poblaciones CD8 T_{EM} y T_{TE} en mayor medida que los anticuerpos de referencia 20H4.9, YW243.55.570 y una mezcla de los mismos, lo que indica que mejora la citotoxicidad de células T CD8 mejor que una mezcla de estos anticuerpos de referencia.

Conclusión

Estos resultados concuerdan con la observación anterior de que los anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 aumentan la producción de IL-2, TNF α e IFN γ por PBMC tras la estimulación con SEB. Demuestran que

PB17311 provoca un aumento significativo del número de células T que expresan citocinas, y que PB17311 induce la expresión del marcador de citotoxicidad CD107a en los subconjuntos CD8 T_{EM} y T_{TE} de forma más potente que los anticuerpos de referencia 20H4.9 e YW243.55.570. Cabe destacar que, la producción de IFN γ y TNF α de las poblaciones CD8 T_{EM} y T_{TE} también fue mayor después de la incubación con PB17311, en comparación con la producción de IFN γ y TNF α después de la incubación con 20H4.9, YW243.55.570 o una mezcla de los mismos, lo que indica que PB17311 tiene un mayor potencial de activación de células T CD8+. La producción de IL-2 de la población CD4 T_{EM} también pareció ser mayor después de la incubación con PB17311, en comparación con la incubación con 20H4.9 y, en menor medida, con YW243.55.570.

Ejemplo 14

Efecto de PB17311 sobre la proliferación de células T infiltrantes de tumores

El cribado inicial de los anticuerpos biespecíficos anti-CD137xPD-L1 hizo uso de ensayos basados en células T primarias. Sin embargo, tales ensayos carecen de la complejidad de las interacciones celulares que impulsan la coevolución del tumor y su microambiente. Para probar nuestros anticuerpos biespecíficos en un entorno tumoral, también utilizamos ensayos recientemente desarrollados basados en células T aisladas de material tumoral de pacientes. Zhou et al. han desarrollado un método para obtener material tumoral fresco de pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) o cáncer colorrectal (CRC) y aislar células infiltradas en el tumor (células mieloides y linfocíticas) para probar los efectos de los anticuerpos dirigidos contra inhibidores de puntos de control inmunitarios en las funciones de las células T infiltradas en el tumor (Zhou et al., 2017). En el presente documento obtuvimos material de pacientes con HCC o metástasis hepática en CRC (LM-CRC) para probar si el anticuerpo biespecífico anti-CD137xPD-L1 PB17311 podría reactivar las células T CD4 y CD8 infiltrantes de tumores derivadas de estos pacientes.

[Métodos]

Con este fin, se obtuvo material tumoral fresco de cuatro pacientes con LM-CRC, y de tres pacientes con HCC elegibles para la resección quirúrgica del tumor. Ninguno de los pacientes recibió quimioterapia o tratamiento inmunosupresor al menos tres meses antes de la cirugía. El método como se describe por Zhou et al. (2017) fue el siguiente: se aislaron células mieloides y linfocíticas infiltrantes en el tumor a partir de tejido fresco al cortarlo en pequeños trozos, seguido de una digestión durante 20-30 minutos a 37 °C en 0.5 mg/ml de colagenasa IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 0.2 mg/ml de DNase I (Roche, Indianapolis, IN). La suspensión celular resultante se filtró a través de tamices celulares de 100 μ m de poro (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica), y los leucocitos mononucleares se obtuvieron por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. La viabilidad se determinó por exclusión con azul tripán. A continuación, las células se marcaron con 0.1 μ M del colorante fluorescente carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE, Invitrogen) y se suspendieron en medio RPMI suplementado con suero AB humano al 10 %, L-glutamina 2 mM, tampón HEPES 50 mM, penicilina-estreptomina al 1 %, piruvato de sodio 5 mM y 1% de aminoácidos no esenciales de medio esencial mínimo (MEM NEAA). A continuación, se transfirieron a cada pocillo de una placa de fondo redondo de 96 pocillos 1 X 10⁵ células de HCC y 1-2 X 10⁵ de células de LM-CRC en 100 μ l. A continuación se estimularon los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) para inducir su activación en ausencia o presencia del anticuerpo de prueba de la siguiente manera a los pocillos que contenían TIL derivados de pacientes con HCC, se agregaron 100 μ l del mismo medio que contenía anticuerpos de prueba y 1 X 10⁵ blastos de células B autólogas activadas por CD40 que se habían expandido y posteriormente transfectado con ARNm que codificaba los antígenos tumorales de longitud completa glipican-3 (GPC3) o antígeno C2 asociado a melanoma (MAGEC2). Estas células se cocubaron durante seis días. A los pocillos que contenían TIL derivadas de pacientes con LM-CRC se agregaron 100 μ l del mismo medio que contenía anticuerpos de prueba y dynabeads recubiertas con anti-CD3/CD28 humano (Gibco-Life Technologies AS, Noruega) durante cuatro días. Después de la incubación, se cosecharon las células marcadas con CFSE y se tiñeron con anticuerpos CD8, CD4 y CD3. Las células muertas se excluyeron utilizando 7-Aminoactinomicina D (7AAD; Invitrogen, Paisley UK), y la proliferación de células T se determinó en base a la dilución de CFSE mediante análisis de citometría de flujo. Las células se midieron con un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, EE.UU.) y se analizaron utilizando el software FlowJo.

El anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 PB17311 se comparó con sus anticuerpos parentales bivalentes mono-específicos PG6797 y PG7702, y con el anticuerpo de referencia anti-CD137 20H4.9, el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 YW243.55.570, y el anticuerpo de control negativo PG2708 contra el antígeno RSV-G irrelevante. Las muestras sin anticuerpo se incluyeron como controles y todas las condiciones se probaron en duplo a una concentración de IgG de 10 μ g/ml.

Para las muestras derivadas de LM-CRC, la proliferación de células T CD4 en presencia de anticuerpos sólo pudo determinarse en tres de los cuatro donantes porque el nivel de referencia de proliferación de células T CD4 del cuarto donante ya era excepcionalmente alto (> 60 % de células proliferantes). La proliferación de células T CD8 se pudo determinar en las muestras de los cuatro donantes de LM-CRC. En cuanto a las muestras derivadas de HCC, se generaron células B autólogas que expresaban GPC3 en los tres donantes,

pero la expresión de MAGEC2 sólo fue posible en dos de los tres. Esto dio lugar a un total de 5 experimentos de proliferación utilizando las células de los tres donantes de HCC.

Los resultados se presentaron como la media $\pm$ EEM.

Resultados

- 5 Los resultados se muestran en la Figura 38. La proliferación de referencia de TIL CD4 (panel superior derecho) y TIL CD8 (panel inferior derecho) se determinó al medir el porcentaje de células T proliferantes (niveles bajos de CFSE) en presencia de anticuerpo de control negativo. La proliferación de CD4 (arriba a la izquierda) y CD8 (abajo a la izquierda) de las muestras se calculó como el aumento porcentual de la proliferación con respecto al valor de referencia. Los valores son la media $\pm$ EEM (LM-CRC: CD4 n=3, CD8 n=4; HCC: CD4 y CD8 n=5).
- 10 El anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 PB17311 mejoró claramente la proliferación de TIL CD4 y CD8 en ambos tipos de tumor, y los resultados indican que superó a sus anticuerpos parentales PG6797 y PG7702. Los resultados también indican que YW243.55.S70 estimuló la proliferación de células T CD4 y CD8 al mismo nivel. PB17311 y 20H4.9 también mejoraron la proliferación de células T CD4, pero mejora de forma más potente la de células T CD8.
- 15 Estos experimentos demuestran el valor agregado de utilizar un anticuerpo biespecífico CD137 x PD-L1 y que PB17311 mejora la proliferación de TIL CD4 y CD8 derivadas de pacientes con HCC y LM-CRC. Es importante destacar que esto significa que un anticuerpo biespecífico de acuerdo con la presente invención puede volver a estimular tanto las células T CD4+ específicas de antígeno como las células T CD8+ específicas de antígeno de un paciente con cáncer, y que puede estimular la proliferación de TIL CD8+ más potentemente que el
- 20 anticuerpo de referencia YW243.55.570.

Ejemplo 15

Análisis del epítipo PB17311 a través escaneo de alanina

Se realizó un análisis de epítipos para identificar los conjuntos de residuos que comprenden o forman parte de los epítipos reconocidos por el brazo Fab anti-CD137 (MF6797) presente en PB17311.

- 25 El análisis del epítipo potencialmente no lineal del antígeno CD137 al que se une PB17311 requiere el conocimiento de la estructura proteica tridimensional de CD137. CD137 es una proteína relativamente pequeña de 25.4 kDa (17.3 kDa extracelular) sin dominios claramente diferenciados. Sin embargo, se han descrito 'regiones repetitivas' definidas o dominios ricos en cisteína (CRD) para CD137. Los informes publicados sobre la estructura proteica de CD137 son limitados. Yi et al. (2014) han descrito que el sitio de unión del ligando de
- 30 CD137 se localiza en la región 3 de CD137, en base a estudios de unión con construcciones de expresión truncadas. Aunque no se dispone de una estructura cristalina para CD137, se ha publicado un modelo homológico basado en TNFR1 (Won et al., 2010). TNFR1 es una proteína de membrana de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral de la que CD137 también es miembro. Los resultados de los experimentos de dominio/intercambio con construcciones quiméricas de CD137 humano/ratón sugieren que el
- 35 brazo Fab anti-CD137 (MF6797) se une a CRD 1 y/o 2. Los datos de bloqueo de CD137L también sugieren que el epítipo MF6797 está cerca o se solapa con el sitio de unión del ligando CD137.

PD-L1 es también una proteína relativamente pequeña de 31.1 kDa (25.2 kDa extracelular), para la que no se han definido regiones o dominios distintos. Sin embargo, se conoce la estructura cristalina de PD-L1, así como la de su complejo con PD-L1.

- 40 En estos experimentos, se utilizó mutagénesis de escopeta para generar una serie de proteínas mutantes en las que se mutó un único residuo a través de sustitución con un residuo de alanina. A continuación, las proteínas CD137 mutantes se expresaron en células humanas, lo que permitió analizar proteínas complejas o proteínas que sólo se pueden expresar y plegar correctamente en células humanas. La unión funcional al anticuerpo se midió mediante tinción fluorescente, lo que dio lugar a mapas de unión y a la identificación de residuos críticos
- 45 para la unión al anticuerpo. Integral Molecular llevó a cabo los experimentos de mutagénesis en escopeta y el análisis utilizando los métodos descritos en Davidson y Doranz (2014).

- En primer lugar, en base a un plásmido portador de ADNc de CD137 de tipo silvestre, se generaron bibliotecas de mutaciones (Xxx a Ala, Ala a Ser) para las proteínas diana. Esto dio lugar a 163 clones de ADNc mutante para CD137, todos los cuales se secuenciaron para verificar la mutación. Estos clones mutantes de ADNc se
- 50 transfectaron posteriormente en células HEK-293T, junto con construcciones de tipo silvestre (WT) para comparación. Las células HEK-293T que expresaban cada uno de los clones mutantes se analizaron posteriormente mediante citometría de flujo, en la que se comparó la unión de cada proteína mutante a PB17311 con la unión a un anticuerpo de control específico para CD137 (IgG1 de ratón, BD Biosciences No. de cat. 555955). Este anticuerpo de control no compite con PB17311 en la unión. Se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia contra IgG humana o de ratón para detectar la unión de PB17311 o
- 55 del anticuerpo de control.

Para identificar los clones que tenían alta expresión de CD137 pero daban baja unión con PB17311, comparamos la unión de PB17311 con la del anticuerpo de control relevante (ver Figura 39A). Para cada clon, el valor medio de unión se graficó en función del valor medio de expresión del clon medido por la unión del anticuerpo de control. Para identificar los clones críticos preliminares, aplicamos umbrales de > 70 % de unión WT al anticuerpo de control y < 20 % de reactividad WT al Ab PB17311. Los clones críticos preliminares identificados utilizando estos umbrales se muestran como círculos negros en la Figura 39A.

Los resultados indican que los residuos importantes en CD137 para la unión de PB17311 son Arg66, Gly70 y Phe72. Val71 también parece estar implicado en la unión de PB17311 (véase la Figura 39B). Aunque Cys133 se identificó inicialmente como un residuo crítico basado en los umbrales de unión, está relativamente alejado de los otros residuos críticos, y las mutaciones de cisteína tienden a causar ligeras aberraciones en la conformación de la proteína debido a la interrupción de los enlaces disulfuro. Por lo tanto, Cys133 no se consideró parte del epítipo PB17311. Las bajas reactividades con PB17311 de las proteínas mutadas en Arg66, Gly70 y Phe72 indican que estos residuos son los principales contribuyentes energéticos a la unión de PB17311, con una contribución menor de Val71.

Ejemplo 16

Eficacia antitumoral del anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 en un modelo de xenoinjerto de ratón

Para probar la eficacia antitumoral de uno de los clones de ejemplo, el anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 PB17311, en animales de experimentación y compararlo con anticuerpos de referencia, se administró el anticuerpo PB17311 a ratones portadores de tumores xenoinjertados. El modelo de ratón elegido es uno en el que ratones inmunocomprometidos se humanizan mediante el injerto con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) antes de la inyección con una estirpe celular de cáncer humano. A continuación, se evalúa el crecimiento del tumor sólido subcutáneo durante un periodo de 3 semanas.

Los Fabs anti-CD137 y anti-PD-L1 del anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 reaccionan de forma cruzada con proteínas ortólogas humanas y de cynomolgus, pero no con proteínas de ratón. Se eligió el modelo anterior porque permite probar la actividad in vivo del anticuerpo en un sistema humanizado, en el que la respuesta antitumoral del anticuerpo está mediada por células T humanas y no por células T de ratón. Este tipo de modelo se ha utilizado con éxito para evaluar diversas terapias inmunomoduladoras dirigidas, que incluyen varios anticuerpos monoclonales anti-CD137. Por ejemplo la eficacia de 20H4.9 se ha evaluado en ratones Rag2-/-IL2Rgnull humanizados con PBMC y portadores de células HT29 (Sanmamed et al. 2015), la eficacia de Utomilumab se ha evaluado en ratones SCID-beige xenoinjertados con una mezcla de PBMC y células tumorales humanas PC3, LoVo o WM-266 (Fisher et al. 2012), 2012). En ambos modelos, los anticuerpos monoclonales anti-CD137 mostraron una actividad antitumoral mediada por células T significativa en comparación con los animales tratados con IgG de control.

En el modelo de xenoinjerto de ratón utilizado en el presente documento, las células cancerosas inyectadas en los ratones humanizados con PBMC fueron células RKO, una estirpe celular de carcinoma de colon humano bien establecida que expresa niveles relativamente altos de PD-L1 pero no CD137. El hecho de que se haya demostrado que las PBMC inyectadas en ratones inmunocomprometidos expresan CD137 ya a los 5 días de la implantación y continúan expresándolo al menos hasta el día 22 (Sanmamed et al 2015) indica que los ratones PBMC-humanizados portadores de células RKO son un modelo ideal para expresar las dianas del anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 en una configuración "trans" (PD-L1 en células RKO y CD137 en células T). Además, el donante de PBMC no provoca la enfermedad injerto contra huésped durante al menos 40 días tras el injerto. Este modelo es por tanto robusto para evaluar la eficacia de agentes inmunomoduladores.

Métodos

Ratones hembra NOD SCID Gamma (NSG) de nueve semanas de edad fueron injertados con 3×10^7 PBMC humanas por inyección en la vena caudal. 7 días después, cada ratón de prueba recibió una inyección subcutánea de 5×10^6 células tumorales RKO en 0.1 ml de Matrigel al 50 % en el flanco derecho. El crecimiento tumoral se monitorizó con calibradores a medida que el volumen tumoral medio se acercaba al rango diana de 50 a 80 mm³. Cuatro días después de la implantación de las células tumorales, designado como Día 1 del estudio, los animales con volúmenes tumorales individuales de 40 a 63 mm³ se clasificaron en cuatro grupos de ocho animales. Los animales portadores de tumores de cada grupo recibieron seis inyecciones intraperitoneales de anticuerpo a una dosis de 100 pg en 100 µl de PBS los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18. Los cuatro grupos diferentes recibieron un control negativo (PBS). Los cuatro grupos diferentes recibieron un control negativo (IgG), o el anticuerpo de referencia 20H4.9 (anti-CD137) o YW243.55.S70 (anti-PD-L1), o PB17311 (anti-CD137xPD-L1). Se utilizaron calibradores para medir los volúmenes tumorales tres veces por semana hasta el final del estudio el día 19, cuando se evaluó la inhibición del crecimiento tumoral.

La inhibición del crecimiento tumoral (TGI) se definió como la diferencia porcentual entre la mediana de volúmenes tumorales (MTV) del día 19 de los ratones tratados y los de control, y las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas a $P \leq 0.05$ mediante la prueba de Mann-Whitney. La

tolerabilidad del tratamiento se evaluó mediante mediciones del peso corporal y observaciones frecuentes de signos clínicos de acontecimientos adversos relacionados con el tratamiento. La Figura 40 proporciona un diagrama de cajas y bigotes de la distribución del volumen tumoral por grupos. El día 19, la mediana de los volúmenes tumorales (MTV) de los ratones en el control IgG fue de 517 mm³, con un rango de volumen tumoral individual de 429 a 807 mm³. Entre los tres grupos de tratamiento, PB17311 fue tan eficaz (con un MTV de 264 mm³, 49 % de TGI), como YW243.55.570, con un MTV de 283 mm³, 45 % de TGI y 20H4.9, con un MTV de 339 mm³ y 34 % de TGI). Todos los tratamientos dieron lugar a MTV significativamente inferiores a los del grupo de control ($P < 0.05$ para 20H4.9; $P < 0.001$ para PB17311 e YW243.55.570). Un animal que recibió 20H4.9 murió el día 8; la necropsia reveló pulmones rosados e hígado moteado. Los animales de este grupo también experimentaron la mayor pérdida media de BW (-8.0 % en el punto más bajo el día 15). Por lo demás, los tratamientos fueron bien tolerados.

En resumen, el anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 PB17311 proporcionó un beneficio de supervivencia estadísticamente significativo como tratamiento para el carcinoma de colon humano RKO en ratones NSG injertados con PBMC humanas. Los resultados del tratamiento con PB17311 fueron mejores, con menos efectos secundarios, en comparación con 20H4.9.

Ejemplo 17

Interferencia de sCD137 con la actividad agonística de anticuerpos dirigidos contra CD137

El CD137 soluble interfiere menos con la actividad agonística del anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico que con el anticuerpo CD137 bivalente.

La expresión de CD137 está regulada por el desprendimiento de antígeno de la superficie celular. El antígeno desprendido (sCD137) se encuentra tanto en la sangre como en el espacio extracelular y, por lo tanto, podría actuar como un sumidero competidor para la eliminación de anticuerpos dirigidos contra CD137.

Los estudios han mostrado que el sCD137 se desprende de células inmunitarias que expresan altos niveles de CD137, como las células T reguladoras (Ridgway et al., 2014), y que tanto el sCD137 como el sCD137L son producidos por células cancerosas de pacientes colorrectales (Dimberg et al., 2006). Además, la exposición de estirpes celulares tumorales a condiciones de hipoxia promueve la expresión de CD137, siendo la forma más predominante la variante soluble (Labiano et al, 2016). Mientras que los niveles séricos en promedio de sCD137 en donantes sanos varían desde 0.02 hasta 0.2 ng/ml, se sabe que los niveles son más elevados en diversos estados de enfermedad, variando desde 0.2 hasta 3.6 ng/ml (Michel et al, 1998; Shao et al, 2012). sCD137 parece regular las células T activadas: cuando se desprende en el microambiente tumoral amortigua la actividad del sistema inmunitario, mediando de esta manera el escape inmunitario. Se considera que sCD137 compite con CD137 unido a la membrana para unirse a CD137L, bloqueando de esta manera la señalización a través de CD137 expresado en las células T.

Dados los mecanismos descritos anteriormente, se determinó si sCD137 afectaría la capacidad del anticuerpo biespecífico CD137xPD-L1 PB17311 y los anticuerpos de referencia para activar células T primarias humanas *in vitro*. Dicha activación se midió en un ensayo de transactivación Jurkat indicador/CHO-PD-L1 en ausencia o presencia de cantidades excesivas de sCD137. En este ensayo, la estirpe de células T indicadoras Jurkat expresa CD137 y el gen indicador se activa mediante anticuerpos específicos para CD137. Las células T se cocultivan con células CHO que sobreexpresan PD-L1, que imitan a las células tumorales que expresan PD-L1 y son necesarias para la activación de las células T por el anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico.

Con este fin, placas de 96 pocillos de fondo plano (Costar, No. de cat. 3917) se recubrieron durante la noche con 2 µg/ml de anticuerpo anti-CD3 OKT-3 (eBioscience, No. de cat. 16-0037-85) en PBS. Al día siguiente, se descongelaron las células indicadoras Jurkat CD137-NFκB-luc y se lavaron con medio DMEM/F12 que contenía un suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (medio de ensayo). Las células se resuspendieron a una densidad de 2×10^6 células/ml. Las placas de 96 pocillos recubiertas previamente se lavaron dos veces con PBS antes de la adición de 25 µl de anticuerpo de prueba (concentración final 200 ng/ml), seguido de 25 µl de una mezcla de sCD137 (R&D, No. de cat. 9220-4B) en una dilución triple en cinco etapas empezando a 20 µg/ml (concentración final). A continuación, se agregaron 25 µl de Jurkat NFκB-luc (50000 células/pocillo, 2×10^6 células/ml), seguidas de 25 µl de células CHO-K1/CHO.huPD-L1 (12500 células/pocillo, 5×10^5 células/ml). Al día siguiente, las placas se equilibraron a temperatura ambiente y se agregaron 100 µl de Bright-Glo/pocillo (temperatura ambiente) (máximo 4 placas a la vez) seguidas de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente. Las placas se midieron en el Lector de Microplacas Multimodo Biotek Synergy 2 (modo de luminiscencia). La activación en términos de actividad luciferasa se expresó como porcentaje de la obtenida sin adición de proteína recombinante.

Los resultados se muestran en la Figura 41 e indican que altas concentraciones de CD137 soluble pueden efectivamente interferir con la actividad agonística de ambos anticuerpos de prueba. Sin embargo, de manera importante, la competencia de sCD137 parece tener un efecto mucho mayor sobre el anticuerpo de referencia anti-CD137 (clon 20H4.9) que sobre el anticuerpo CD137xPD-L1 biespecífico PB17311. De esto se concluye

que el efecto *in vivo* de PB17311 será menos sensible a los mecanismos inmunosupresores en comparación con el anticuerpo de referencia 20H4.9

Tablas

- 5 Tabla 1: Las construcciones de expresión para cada diana que se utilizaron para la inmunización con ADN (basados en el vector pVAX1) y para la generación de estirpes celulares estables Freestyle 293F o CHO-K1 (basadas en el vector pIRES-neo3 o similares).

Diana	Vectores	Estirpe celular estable
CD137	pVAX1_huCD137	NA
	pVAX1_raCD137	NA
	pIRES-neo3_huCD137	Freestyle 293F_huCD137
	pIRES-neo3_maCD137	Freestyle 293F_maCD137
OX40	pVAX1_huOX40	NA
	pVAX1_raOX40	NA
	pVAX1_maOX40	NA
	pIRES-neo3_huOX40	Freestyle 293F_huOX40
	pIRES-neo3_maOX40	Freestyle 293F_maOX40
PD-L1	pVAX1_huPD-L1	NA
	pIRES-neo3_huPD-L1	CHO-K1_huPD-L1
	pIRES-neo3_maPD-L1	CHO-K1_maPD-L1
hu = humano, ma = macaco, NA = no aplicable		

Tabla 2.

Panel de brazos Fab de CD 137 que describen la combinación basada en perfiles FACS, unión a dominios, actividad agonística como anticuerpo bivalente y actividad de bloqueo de CD137.					
MF no.	Depósito	Dominio	Agonística bivalente	% de Bloqueo de CD137L	Denotación
MF6783	A	1/2	X	44	Parcialmente bloqueado
MF6860	A	1/2	X	6	Sin bloqueo
MF6848	B	1/2		-126	Mejorado
MF6856	B	2		24	Sin bloqueo
MF6861	B	1/2		50	Parcialmente bloqueado
MF6847	C	4		24	Sin bloqueo
MF6795	D	ND		32	Parcialmente bloqueado
MF6808	D	ND		77	Bloqueado
MF6798	E	1		44	Parcialmente bloqueado

MF6805	E	1		2	Sin bloqueo
MF6832	E	1	X	8	Sin bloqueo
MF6754	F	2		101	Bloqueado
MF6763	F	2		101	Bloqueado
MF6744	G	2/3	X	67	Parcialmente bloqueado
MF6785	G	2		99	Bloqueado
MF6825	G	2	X	89	Bloqueado
MF6737	H	3	X	76	Bloqueado
MF6749	H	3	X	81	Bloqueado
MF6870	I	4		-16	Sin bloqueo
MF6862	J	ND	X	-80	Mejorado
MF6875	J	1		-22	Sin bloqueo
MF6788	K	1	X	55	Parcialmente bloqueado
MF6797	K	1/2		102	Bloqueado
MF6873	K	1/2		-100	Mejorado

Tabla 3.

Actividad funcional de los brazos PD-L1 Fab según se mide en el ensayo indicador de bloqueo PD-1/PD-L1 como anticuerpo monovalente expresado en AUC. Las afinidades de los anticuerpos se determinaron mediante análisis Biacore. MF5361 es un Fab no bloqueante, por lo tanto el AUC no fue aplicable (NA)		
ID	AUC	Afinidad nM
MF5594	4.8	0.6
MF5553	4.5	ND
MF5424	3.6	4.6
MF5561	3.6	4.1
MF5426	3.4	2.5
MF5439	3.2	5.5
MF5442	3.1	6.0
MF5361	NA	19.4

ES 2 981 272 T3

Tabla 4.

Actividad funcional (IC ₅₀ liberación de IL-2 en el ensayo SEB) del panel líder CD137xPD-L1 (indicado utilizando el prefijo PB; cada PB comprende un brazo Fab de CD137 y otro de PD-L1, como se indica en la tabla) en comparación con ipilimumab. En base a los perfiles de unión utilizando construcciones quiméricas, CD137 se podría distribuir en diferentes intervalos de dominio.					
ID	Brazo Fab de CD137	Brazo Fab de PD-L1	Dominio CD137	AUC	IC50 (ng/ml)
PB14593	6797	5594	1/2	4.8	14.75
PB14591	6785	5594	2	4.8	15.44
PB14584	6754	5594	2	4.8	15.76
PB15184	6754	5424	2	3.6	22.82
PB15142	6754	5426	2	3.4	34.06
PB17101	6754	5553	2	4.5	56.24
PB17089	6754	5442	2	3.1	74.35
PB17095	6797	5442	1/2	3.1	89.42
PB17103	6785	5553	2	4.5	92.27
PB14814	6754	5561	2	3.6	167.4
PB15149	6785	5426	2	3.4	188.1
PB14815	6763	5561	2	3.6	195.6
PB14585	6763	5594	2	4.8	198
PB14821	6785	5561	2	3.6	202.2
PB15151	6797	5426	1/2	3.4	219.3
PB15191	6785	5424	2	3.6	284.2
PB15143	6763	5426	2	3.4	331.1
PB15185	6763	5424	2	3.6	363
PB14823	6797	5561	1/2	3.6	367.9
PB17091	6785	5442	2	3.1	428.2
PB17088	6763	5442	2	3.1	545.9
PB17115	6785	5439	2	3.2	664.3
PB17107	6797	5553	1/2	4.5	852.6
PB17119	6797	5439	1/2	3.2	1030
PB17112	6763	5439	2	3.2	1043
PB17100	6763	5553	2	4.5	1382
PB15193	6797	5424	1/2	3.6	1556
PB17113	6754	5439	2	3.2	8145
Ipilimumab					9388

ES 2 981 272 T3

Tabla 5 Capacidad de bloqueo del ligando y especificidad de dominio de los clones OX40. La capacidad de bloqueo se determinó en dos experimentos separados. NA = no analizado; ND = no determinado (no se pudo determinar la especificidad de dominio debido a la unión tanto a OX40 de rata como a OX40 humano.

MF nr.	CDR3	Línea germinal VH	Exp. 1 de bloqueo (%)	Exp. 2 de bloqueo (%)	OX40L de bloqueo	Espec. de dominio.
MF6629	GWDF	VH5-51	-1	NA	no	NA
MF6630	GGTMVRGVDDWFDP	VH1-46	4	NA	no	1/2
MF6637	VGGLRQAWYFDL	VH1-69	9	NA	no	NA
MF6643	GGWELLFNYYFQQ	VH7-4-1	11	NA	no	3
MF6645	SPPYYMDV	VH4-59	20	NA	no	3
MF6646	GFDWYFTL	VH3-15	47	62	si	3
MF6648	GWGYSGYGPEGFDI	VH3-15	22	NA	no	2
MF6655	IGGTGTTDWYFDL	VH1-69	NA	10	no	1/2
MF6658	VGGYTSSSWFFDL	VH1-69	9	NA	no	1/2
MF6660	VDGGNSDWYFDL	VH1-69	14	NA	no	NA
MF6675	VDGRSSGGNWHFDL	VH1-69	5	NA	no	1/2
MF6686	DPYYFDSNGYPPFD	VH1-69	NA	97	si	NA
MF6690	GWDFDS	VH7-4-1	7	NA	no	NA
MF6692	VGGLGTTPHWYFDL	VH1-69	NA	16	no	1/2
MF6700	PSYNWNRLYYYYMDV	VH1-69	7	NA	no	3
MF6706	SQPNLDFWSGYHFDY	VH2-5	99	97	si	NA
MF6714	DPFFYDRSGYPPFDY	VH1-69	36	57	si	2
MF6721	GWGSG	VH3-15	NA	9	no	4
MF6722	VGGYGNNYNFDY	VH1-69	24	NA	no	NA
MF6724	DPSGSYFYHYMDV	VH3-15	75	92	si	2
MF6728	RRPNYDSWSGYEDY	VH2-5	97	101	si	3
MF6729	GGWGLLREYFLQ	VH7-4-1	66	74	si	NA
MF6826	HTGHYSGFDY	VH3-30	1	NA	no	NA
MF6940	VDGTGISNWFYFDL	VH1-69	78	93	si	2
MF6942	GYSSIWHGENFQY	VH7-4-1	28	48	si	3/4
MF6943	DMDNWNYYEGYYVMDV	VH7-4-1	90	87	si	2
MF6944	VEGWGSQWYFDL	VH1-69	18	NA	no	1/2
MF6947	VEGTDSNWGWDF	VH1-69	22	41	no/si	1/2
MF6949	DDGTGTGDYVWGRYRYTLDF	VH7-4-1	NA	90	si	3
MF7331	DGYKLYAADGFDY	VH1-18	NA	18	no	1

ES 2 981 272 T3

MF7332	DMDSYPFYRGFDY	VH1-18	NA	3	no	ND
MF7334	DDNTMWYSRPFYAFDY	VH3-30	4	NA	no	1/2
MF7341	DSPYWSLPGGFDY	VH1-18	15	NA	no	1/2
MF7345	DQRWWYMDPGAGFDY	VH3-30	5	NA	no	1/2
MF7350	DYSYSGTGSSSAFDY	VH1-18	-8	NA	no	2/3
MF7351	DYLHGSYYRGSAFDY	VH3-30	NA	11	no	2/3
MF7352	DSWHGQYYYGKGFY	VH3-30	NA	34	si	2/3
MF7353	DGLGWDPGYGFDY	VH3-30	19	NA	no	2
MF7356	DNYQGMYYFGTGFDY	VH3-30	3	NA	no	2/3
MF7358	DNHYYSPTTYWGFDY	VH3-30	2	NA	no	1/2
MF7365	GGQSQYHSYPFGFDY	VH3-23	NA	46	si	2
MF7366	DWWQGHWYRSGGFDY	VH3-30	NA	35	si	2/3
MF7371	GQMDYYDDWYSAFDY	VH3-30	NA	1	no	1
MF7372	DYYQGSHYFGPAFDY	VH3-30	NA	-4	no	2/3
MF7374	GDDNRMYSNPKGFDY	VH3-30	21	NA	no	2
MF7378	DNTQGNYYRSRGFDY	VH3-30	2	NA	no	2/3
MF7382	DGLQGSNYHLGGFDY	VH3-30	NA	5	no	2/3
MF7383	GYDMYGGWGAWGFDY	VH3-23	-6	NA	no	2
MF7394	DYPAWAYSFAFDY	VH1-18	NA	67	si	2
MF7395	DYWYYLSDAFDY	VH3-30	NA	8	no	2
MF7397	DHWGSFYGDYFDY	VH3-23	NA	0	no	2

Tabla 6

MF ID	Ab 100 nM			KD (nM)	
	kon	koff	KD		
MF6797	2.49E+05	7.76E-04	3.11E-09	3.0 +/- 0.3 nM	
MF6754	1.45E+06	0.001856	1.28E-09	2.1 +/- 1.1 nM	
MF6763	3.54E+05	0.001033	2.92E-09	5.5 +/- 2.3 nM	
MF6749	8.26E+05	0.002419	2.93E-09	2.7 +/- 1.1 nM	
MF6737	1.56E+06	0.008839	5.68E-09	3.7 +/- 1.8 nM	
MF6805	3.41E+05	6.29E-04	1.84E-09	2.2 +/- 0.5 nM	
MF6785	3.48E+06	0.01575	4.52E-09	4.0 +/- 0.9 nM	
MF6808	2.51E+05	3.98E-04	1.59E-09	1.4 +/-0.5 nM	
MF6744	ND				
MF6788	ND				

ES 2 981 272 T3

MF6825		ND				
--------	--	----	--	--	--	--

Tabla 7. Actividad de anticuerpos biespecíficos CD137xPD-L1 compuestos de 24 Fábs de CD137 y 2 Fábs de PD-L1

MF no. #1	CDR3	Línea germinal VH	Depósito	Domino	Agonística bivalente	% de bloque de CD137L	Indicador PD-L1 NB	PD-L1 B	Célula T PD-L1 NB	PD-L1 B
MF6783	DWGVIGHYMDV	VH7-4-1	A	1/2	X	44	+	++	+	+
MF6880	GLLWKTQYSCFDY	VH5-51	A	1/2	X	6	+/-	+	-	-
MF6861	DSDGYGPKAFDY	VH1-18	B	1/2		50	-	-	ND	ND
MF6850	DWGSWDYGSADFY	VH3-23	B	1/2		24	-	-	ND	ND
MF6848	DWGSWGSPYAFDY	VH1-18	B	1/2		-126	-	-	ND	ND
MF6847	DSCYDSAYLAFDY	VH1-18	C	4		24	-	-	ND	ND
MF6808	GATYYGSGTYYSINWFDP	VH1-69	D	ND		77	+	++	++	+++
MF6795	FYTGIVGATGAFDY	VH5-51	D	ND		32	-	-	ND	ND
MF6790	DWASVMVRGILDY	VH7-4-1	E	1		44	+/-	+/-	ND	ND
MF6832	GWNAFWFDY	VH3-23	E	1	X	6	+/-	+	-	-
MF6805	TEYSYGVFY	VH7-4-1	E	1		2	+/-	+	+	++
MF6754	EGFDNYGSGIRGNWFDP	VH1-24	F	3		101	+	++	++	+++
MF6763	EGGVIRGNWFDP	VH1-24	F	3		101	+	++	++	...
MF6785	DLRLGASYYSYMDV	VH1-24	G	2/3		99	+	++	+	++
MF6826	TLWGSDDVFDV	VH2-5	G	2	X	89	+	++	+	++
MF6744	LGYSGYAEDFVDF	VH5-51	G	2	X	67	+	++	+	++
MF6749	HAGFIITSONIDDY	VH5-51	H	3	X	81	+	++	+	+++
MF6737	HQGSFSGSHIDDY	VH5-51	H	3	X	76	+	++	+	++
MF6870	GSGHRFYQYRSYGFY	VH3-23	I	4		-16	-	-	ND	ND
MF6875	GRWWFTYDGFY	VH3-23	J	ND		-22	+/-	+	-	-
MF6882	GRGWRNYFQWVGFY	VH3-30	J	ND	X	-80	+/-	+	-	-
MF6797	EGIGFLGNNWFDP	VH2-5	K	1/2		102	+	++	+	++
MF6788	DWGLVAIGYFDY	VH7-4-1	K	1/2	X	55	+	++	+	++

(continuación)

MF no. #1	CDR3	Línea germinal VH	Depósito	Dominio	Agonística	% de bloque de CD137L	Indicador	PD-L1	Célula T
MF6873	DRWSWYQGRGFGDY	VH1-18	K	1/2	bivalente	~100	PD-L1	NB	PD-L1
								B	NB
								-	ND
								-	ND

MF, ID único de Fab; CDR3, secuencia de CDR3; VH germinal, VH derivado; depósito, agrupación específica en el depósito (P1308-S33); Dominio, dominio CD137 al que se mapeó el anticuerpo utilizando construcciones de dominios intercambiados de ratón y humano (1 o 2 significa que el anticuerpo no se pudo mapear claramente a uno de los dos dominios); Agonista bivalente, capacidad del anticuerpo bivalente para activar Jurkat-NFkB-luc-CD137; % de bloqueo de CD137L, capacidad del brazo Fab para bloquear la interacción con CD137; Indicador, datos del ensayo indicador; Célula T, datos del ensayo de células T; PD-L1 NB, Fab de CD137 en combinación con brazo Fab no bloqueante de PD-L1; PD-L1 B, Fab de CD137 en combinación con el brazo Fab bloqueante de PD-L1.

Referencias

- Akbay, E. A., Koyama, S., Carretero, J., Altabef, A., Tchaicha, J. H., Christensen, C. L., Mikse, O. R., Cherniack, A. D., Beauchamp, E. M., Pugh, T. J., et al. (2013). Activation of the PD-1 Pathway Contributes to Immune Escape in EGFR-Driven Lung Tumors. *Cancer Discov* 3, 1355-1363
- 5 Arch, R. H., & Thompson, C. B. (1998). 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol Cell Biol*, 18(1), 558-65. <http://doi.org/10.1016/j.bulcan.2015.03.022>
- Bernstein, M. B., Garnett, C. T., Zhang, H., Velcich, A., Wattenberg, M. M., Gameiro, S. R., Kalnicki, S., Hodge, J. W., and Guha, C. (2014). Radiation-induced modulation of costimulatory and coinhibitory T-cell signaling molecules on human prostate carcinoma cells promotes productive antitumor immune interactions. *Cancer Biother Radiopharm* 29, 153-161
- 10 Bertram et al. Role of T cell costimulation in anti-viral immunity. *Seminars in Immunology*, 16(3), 2004
- Boland, J. M., Kwon, E. D., Harrington, S. M., Wampfler, J. A., Tang, H., Yang, P., and Aubry, M. C. (2013). Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Lung Cancer* 14, 157-163.
- 15 Compaan, D.M., Hymowitz, S.G. (2006). The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. *Structure* 14, 1321-1330.
- Davidson, E. and Doranz, B.J. (2014) A high-throughput shotgun mutagenesis approach to mapping B-cell antibody epitope. *Immunology* 143, 13-20.
- 20 Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800.
- Makkouk A, Chester C, Kohrt H. Rationale for anti-CD137 cancer immunotherapy. *Eur J of Cancer* 54 (2016): 112-119
- 25 McNamara J, Kolonias D, Pastor F, Mittler R, Chen L, Giangrande P, Sullenger B, Gilboa E. Multivalent 4-1 BB binding aptamers costimulate CD8+ T cells and inhibit tumor growth in mice.
- Melero I, Hirschhorn-Cymerman D, Morales-Kastresana A, Sanmamed MF, Wolchok JD. Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clin Cancer Res* 2013.
- Michel, J., et al., A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 1998. 28(1): p. 290-295.
- 30 Fisher et al. Targeting of 4-1BB by monoclonal antibody PF-05082566 enhances T-cell function and promotes antitumor activity. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 61, 2012.
- Pollok, K. E., Kim, Y. J., Zhou, Z., Hurtado, J., Kim, K. K., Pickard, R. T., & Kwon, B. S. (1993). Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 150(3), 771-81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678621>
- 35 Pulko V, Harris KJ, Liu X, Gibbons RM, Harrington SM, Krco CJ, Kwon ED, Dong H J. B7-H1 expressed by activated CD8 T cells is essential for their survival. *Immunol*. 2011.
- Sanmamed et al. Nivolumab and 20H4.9 enhance antitumor activity of human T lymphocytes engrafted in Rag2-/-IL2 Rnull immunodeficient mice. *Cancer Research*, 75(17), 2015.
- 40 Schwarz H. Biological activities of reverse signal transduction through CD137 ligand. *J Leukoc Biol* 77 (2005): 281-286
- Shao, Z., et al., Admission levels of soluble CD137 are increased in patients with acute pancreatitis and are associated with subsequent complications. *Experimental and Molecular Pathology*, 2012. 92(1): p. 1-6.
- Shao, Z., & Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 21-29. <http://doi.org/10.1189/jlb.0510315>
- 45 Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 168, 707-723. Simon, H. U. (2001). Evidence for a pro-apoptotic function of CD137 in granulocytes. *Swiss Medical Weekly*, 131(31-32), 455-458. <http://doi.org/2001/31/smw-09668>

- Sznol, M., and Chen, L. (2013). Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res* 19, 1021-1034.
- Thompson, R. H., Gillett, M. D., Cheville, J. C., Lohse, C. M., Dong, H., Webster, W. S., Chen, L., Zincke, H., Blute, M. L., Leibovich, B. C., and Kwon, E. D. (2005). Costimulatory molecule B7-H1 in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 104, 2084-2091.
- 5 Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515, 568-571.
- Velcheti, V., Schalper, K. A., Carvajal, D. E., Anagnostou, V. K., Syrigos, K. N., Sznol, M., Herbst, R. S., Gettinger, S. N., Chen, L., and Rimm, D. L. (2014). Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest* 94, 107-116.
- 10 Vinay, D. S., & Kwon, B. S. (2011). 4-1BB signaling beyond T cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 8(4), 281-4. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.82>
- Wolf B., Morgan H., Krieg J., et al. A whole blood in vitro cytokine release assay with aqueous monoclonal antibody presentation for the prediction of therapeutic protein induced cytokine release syndrome in humans. *Cytokine* 60:828-831, 2012.
- 15 Wölfl and Greenberg. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. *Nature protocols* 9(4), 2014
- Won, E. Y., Cha, K., Byun, J. S., Kim, D. D., Shin, S., Ahn, B., ... Cho, H. S. (2010). The structure of the trimer of human 4-1BB ligand is unique among members of the tumor necrosis factor superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 9202-9210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.084442>
- 20 Yi, L., Zhao, Y., Wang, X., Dai, M., Hellstrom, K. E., Hellstrom, I., & Zhang, H. (2014). Human and mouse CD137 have predominantly different binding CRDs to their respective ligands. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086337>
- 25 Zhang, F., Wei, H., Wang, X., Bai, Y., Wang, P., Wu, J., Jiang, X., Wang, Y., Cai, H., Xu, T., Zhou, A. (2017). Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discovery* 3, 17004.
- Zhao et al. Targeting 4-1BB (CD137) to enhance CD8 T cell responses with poxviruses and viral antigens. *Frontiers in Immunology* 3, 2012
- 30 Zhou et al. Antibodies Against Immune Checkpoint Molecules Restore Functions of Tumor-infiltrating T cells in Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology* 2017 doi: 10.1053/j.gastro.2017.06.01

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo biespecífico que comprende un dominio variable que comprende un sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de CD137 en una primera célula y un segundo dominio variable que comprende un sitio de unión a antígeno que puede unir una parte extracelular de PD-L1 en una segunda célula, estimulando de esta manera la actividad de CD137, en el que el dominio variable que une la parte extracelular de CD137 comprende una región variable de cadena ligera común que tiene la secuencia DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLSELSIHWVRQAPGKGVEWMGGFYPED
VEPIYARKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELNSLRSEDTAVYYCAAEGFDNYGSGIRGN
WFDPWGQGTLTVSS ,

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQSPGKGLEWMGSFYFE
DGETIYAQKFQGRITMTEDTSADTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEGVGVIRGNWFD
PWGQGTLTVSS,

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTKLSMHWVRQAPGKGLEWMGCFEPE
DGETINAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDLRLGASYYYSY
MDVWGRGTMVTVSS,

o

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTTGVG VNWIRQPPGEALEWLALIYWND
DTYYSPSLKSRLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAHEGIIGFLGGNWFDP
WGQGTLTVSS.

2. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable que une la parte extracelular de PD-L1 comprende una región variable de cadena ligera común que tiene la secuencia

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

y comprende una región variable de cadena pesada con

- una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias NYAIN, WINPNTGNPTYAAGFTG, y DRKYVTNWVFAEDFQH respectivamente;

una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias TYTII, GIPIFDTPNFAQKFQG, EGCNHGVCYPY respectivamente;

una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias SYGIT, GIPIFGTTNYAQKFQG, RRGYSNPHWLDP respectivamente;

- una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias TYAIN, RIPIFDTANYAQKFQG, DETGYSSSNFQH respectivamente;

una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias TYAIN, GIPIFDTANYAQRFGG, DQTGYSSSTLFDY respectivamente; o

- una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias TYAIS, WIPIFDTGNYAQKIQQ, HDYTNTVDAFDI respectivamente; de acuerdo con la numeración Kabat.

3. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dominio variable que une la parte extracelular de CD137 comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTTGVG VNWIRQPPGEALEWLALIYWND DTYYSPSLKSRLTITKDTSKNQWLMTNMDPVDATYYCAHEGIIGFLGGNWFDP WGQGTLTVSS; y en el

que el dominio variable que une la parte extracelular de PD-L1 comprende una región variable de cadena pesada con una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias NYAIN, WINPNTGNPTYAQQFTG, y DRKYVTNWVFAEDFQH respectivamente; de acuerdo con la numeración Kabat.

- 5 4. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dominio variable que une la parte extracelular de CD137 comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQSPGKGLEWMGSFYPE DGETIYAQKFQGRITMTEDTSADTAYMELSSLRSED TAVYYCATEGVG VIRGNWFD PWGQGLTVTVSS; y en el que el dominio variable que une la parte extracelular de PD-L1 comprende una región variable de cadena pesada con una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias NYAIN, WINPNTGNPTYAQQFTG, y
10 DRKYVTNWVFAEDFQH respectivamente; de acuerdo con la numeración Kabat.

5. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el dominio variable que une la parte extracelular de PD-L1 comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYTFTNYAINWVRQAPGQGLEWMGWINPN
TGNPTYAQQFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAE
DFQHWGRGTLVT.

- 15 6. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dominio variable que une la parte extracelular de CD137 comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTTG VGVNWIRQPPGEALEWLALIYWND DTYYSPLKSRITITKDTSKNQWLTMTNMDPVD TATYYCAHEGIFLG GNWFDW WGQGLTVTVSS; y en el que el dominio variable que une la parte extracelular de PD-L1 comprende una región variable de cadena pesada con una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias TYTII, GIPIFDTPNFAQKFQG, y
20 EGCNHGVCYPY respectivamente; de acuerdo con la numeración Kabat.

7. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el dominio variable que une la parte extracelular de CD137 comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKVSGYTLTELSMHWVRQSPGKGLEWMGSFYPE DGETIYAQKFQGRITMTEDTSADTAYMELSSLRSED TAVYYCATEGVG VIRGNWFD PWGQGLTVTVSS; y en el que el dominio variable que une la parte extracelular de PD-L1 comprende una región variable de cadena pesada con una CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene las secuencias TYTII, GIPIFDTPNFAQKFQG, y
25 EGCNHGVCYPY respectivamente; de acuerdo con la numeración Kabat.

8. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en el que el dominio variable que une la parte extracelular de PD-L1 comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia

EVQLVQSGAEVMRPGSSVKVSKKASGGIFNTYTHI WVRQAPGQGLEWMGGIPIFDT
PNFAQKFQGRITITADKSTNTAYMELTSLRSED TAVYYCAREGCNHGVCYPYWGQ
30 GTLTVTVSS.

9. Un método para estimular la actividad de CD 137 en una célula que comprende proporcionar una primera célula y una segunda célula, en el que dicha primera célula tiene CD137 en la membrana celular y dicha segunda célula tiene PD-L1 en la membrana celular, el método comprende poner en contacto dichas células con el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el método no comprende el tratamiento en un cuerpo humano o animal.
35

10. El anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en un método de terapia.

11. El anticuerpo biespecífico para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho método es para tratar el cáncer.

- 40 12. El anticuerpo biespecífico para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho método es para estimular una respuesta inmunitaria en un individuo contra una célula aberrante en dicho individuo.

13. El anticuerpo, método o anticuerpo biespecífico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo biespecífico es una IgG.

Figura 1A

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIEPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 1B

gacatccagatgaaccagtcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
atcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctacttaaatgggtatcagcagaaacca
I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
gggaaagccccaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca
G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
aggttcagtgaggcagtgatctgggacagctttcactctcaccatcagcagctctgcaacct
R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
gaagatctttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaacctccaacgttcggccaa
E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T F G Q
gggaccaaggtggagatcaaaa
G T K V E I K

Figura 1C

cgaactgtggctgcaaccatctgtcttccatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatct
R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S
ggaaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
tggaaggtggataacgcctcccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagcaggac
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
agcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgag
S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
aaacacaaagtcctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag
K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K
agcttcacacaggggagagtggttag
S F N R G E C -

Figura 1D

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQCTRLEIK

Figura 1E

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

Figura 2

Figura 2A

VH: dependiente del MF (diana): Figura 3

Figura 2B

CH1:

```

gctagcaccsaagggcccatcgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaacctctggg
  A S T R G P S V F P L A P S S K S T S G
ggcacagcgggccctgggctgcctggtaaggactactccccgaacccgggtgacgggtgtcg
  G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
tggaactcaggcgccttgaccagcggcgtgcacaccttccccggctgtcctacagtctctca
  W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
ggactctactccctcagcagcgtcgtgacccgtgccctccagcagcttgggcacccagacc
  G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
tacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacccaaggtggacaagagagtt
  Y I C N V N H K P S N T K V D K R V

```

Figura 2C

Bisagra:

gagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccacccgtgcca
E P K S C D K T H T C P P C P

Figura 2D

CH2:

gcacctgaactcctggggggacccgtcagtccttcttcccccacaaacccaaggacacc
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactggtagcgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtacccgtgtgggtcagcgtcctcacccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccatcgagaaaaccatctccaagccaaa
P I E K T I S K A K

Figura 2E

CH2 que contiene sustituciones de silenciamiento L235G y G236R

gcacctgaactcggcagggggacccgtcagtccttcttcccccacaaacccaaggacacc
A P E L G R G P S V F L F P P K P K D T
ctcatgatctcccgacccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaagac
L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
cctgaggtcaagttcaactggtagcgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaag
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K
ccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtacccgtgtgggtcagcgtcctcacccgtcctgcac
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H
caggactgggtgaatggcaaggagtacaagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagcc
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
cccatcgagaaaaccatctccaagccaaa
P I E K T I S K A K

Figura 2F**CH3: KK de DEKK**

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccaagcccccatcccgggaggagatgaccaag
 G Q P R E P Q V Y T K P P S R E E M T K
 aaccaggtcagcctgaagtgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 N Q V S L K C L V K G F Y P S D I A V E
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
 W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
 gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
 aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 ctctccctgtctccgggttga
 L S L S P G -

Figura 2G**CH3: DE de DEKK**

gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccgaccccccatcccgggaggagatgaccaag
 G Q P R E P Q V Y T D P P S R E E M T K
 aaccaggtcagcctgacctgaggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
 N Q V S L T C E V K G F Y P S D I A V E
 tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
 W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
 gacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
 D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G
 aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagc
 N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 ctctccctgtctccgggttga
 L S L S P G -

Figura 3

Figura 3A

MF6737

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYSFTNYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS
TRYSPSEFQGQVTISADKSISTAYLQWHTLKASDTAMYYCARHQQGYSESGSHIDDYWG
 QGTLVTVSS

MF6744

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPDDSD
TRYSPSEFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKPSDTAMYYCVRLGGYSGYAEDFVDFWGQ
 CTLVTVSS

MF6749

EVQLVQSGAEVRKPGESLKISCKGSGYSFTTYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS
TRYSPSEFQGQVTISADKSISTVYLQWSSLKASDTAMYYCARHAGFIITSQNIDDYWGQ
 GTLVTVSS

MF6754

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLSELSIHWVRQAPGKGVEWMGGFYPEDV
EPIYARKEFQGRVTMTEDTSTDTAYMELNSLRSEDTAVYYCAAEGFDNYCSCGIRGNWF
DPWGQGTLVTVSS

MF6763

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYTLTELSMIWVRQSPGKGLEWMGSFYPEDG
ETIYAQKEFQGRITMTEDTSADTAYMELSSLRSEDTAVYYCATEGVCVIRGNWFDPWG
 QGTLVTVSS

MF6783

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNEAMNWVRRAPGQGLEWMGWINTNT
GNPTYAQGFTGRFVPSLDTSVNTAYLQISSLKAEADTAVYYCARDWGVIGGHYMDVWG
 KGTTVTVSS

MF6785

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTTLTKLSMIHWVRQAPGKGLEWMGGFEPEP
GETINAQKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDLRLGASYYYYSYMD
YWGRGTMVTVSS

MF6788

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNFAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNT
GNPTYAQDETGRFVFSLDTSGNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDDWGLVAIGYEDYWG
QCTLVTVSS

MF6795

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHYPDDSD
TRYSPSEFQCQVTISADKSSSTAYLQWSSSLKASDTAMYYCASEYTGIVGATGAEDVWGQ
GTITVTVSS

MF6797

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTTCYGVNWIRQPPGEALEWLALIWND
TYSPSLKSRLTFTTKDTSKNQVVLTMNMDPVDATYYCAHEGIGFLGCNWEDPWG
QCTLVTVSS

MF6798

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCRASGYTFTNFAMTWVRQAPGQGPEYMGWINTNTG
NPTYAQGETGRFVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDDWASVMVRCIDLYWG
QCTLVTVSS

MF6805

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGWIHTNT
GNPTYAQGETGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLQAEDTAVYYCVRTEYSYGYVEYYWGQG
TLVTVSS

MF6808

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSDAISWVRQAPGQGLEWMGGMIPILGT
ANYAQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCVRGATYYYYGSGTYYSINWF
DPWGQCTLVTVSS

MF6825

QITLKESGPTLVKPTQTLTSLCTFSGFSLSSTSGMSVGVIRQPPGKALEWLALIWND
KYFSPSLKSRLTITKDTSKNQVVI/TLTNMDPVDATATYYCAHTLWGSDDVFDVWGQCT
 MVTVSS

MF6832

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARGWNAFWEDYWGQCTL
 VTVSS

MF6847

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARDSGYDSAYLAEDYW
 GQGTLVTVSS

MF6848

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARDWSGWCSSPYAEDYW
 GQGTLVTVSS

MF6856

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDWSGSWDYGSSAFDY
 WGQGTLVTVSS

MF6860

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHYPGDSD
TRYSPSEFQCQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAVVYCAKGLLWGKTDYYSGFDYW
 GQGTLVTVSS

MF6861

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVVYCARDSDCYGPKAFDYWG
 QGTTLVTVSS

MF6862

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRGWRNYFQWWGF
DYWGQCTLVTVSS

MF6870

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKCSGHRFYQYRSCFDYW
GQCTLVTVSS

MF6873

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDRWSWYQGRGFGFD
YWGQCTLVTVSS

MF6875

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRWWFTYDGFEDYWGQ
GTLTVTVSS

Figura 3B

MF5359

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFTNTYSITWVRQAPGQGLEWMGSIVPIFCTI
NNAQKFQGRVTITADKSANTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDNTMVRGVDDYYMDVW
GKCTMTVTVSS

MF5361

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYSLNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTG
NPTYAQGFETGRFVFSLDSSVTAYLQISSLKAEDTAVYYCTRHDHDFRRGRSLDVWGK
GTTVTVTVSS

MF5377

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGIFSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIEDTP
NYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAVYYCAKNVRGYSAYDLDYWGQGT
 LVTVSS

MF5382

EVQLVQSGAEVKNPGSSVKVSCKATGGTFNTYGTNWVRQAPGQGLEWMGGIPIEGT
ANYAQKFQGRVTITADKSTTTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGGADMGTLDYWGQGT
 LVTVSS

MF5424

EVQLVQSGAEVMRPGSSVKVSCKASGGIFNTYTHWVRQAPGQGLEWMGGIPIEDTP
NFAQKFQGRLTITADKSTNTAYMELTSLRSEDTAVYYCAREGCNHGVCYPYWGQGT
 LVTVSS

MF5426

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFRSYGTTWVRQAPGQGLEWMGGIPIEGT
TNYAQKFQGRVTITADKSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARRRGYSNPHWLDPWGG
 GTLVTVSS

MF5439

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSTYGIWVRQAPGQGLEWMGGIPIECT
ANYAQKFQGRVTITADISTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGGNYEYFYWGQGTL
 VTVSS

MF5442

EVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASGGTFNTYAINWVRQAPGQGLEWVGRIPIEDTA
NYAQKFQGRVTISADKSTTTAYMELSSLRSEDTAVFYCAKDETCGYSSSNFQIHWGQGT
 LVTVSS

MF5553

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAINWVRQAPGQGLEWMGWINPNTG
NPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDFQ
HWGQGTLVTVSS

MF5557

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTENTYSITWVRQAPGQGLEWMGGIIPVECT
SKYAQKFEQDRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPSFSSSSGWEDPWGQ
 GTLVTVSS

MF5561

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTENTYAINWVRQAPGQGLEWMGGIIPEDT
ANYAQRFEQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAKDQTYSSSTLEFDYWGGQ
 TLVTVSS

MF5576

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSHAMNWVRQAPGQGLEWMGWINPNT
GNPTYAQGFTRGVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAIDRGYMSNWVFAEYEP
HWGQGTLVTVSS

MF5594

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSTYAIWVRQAPGQGLEWMGWIIPEDT
GNYAQKIQGRVTITADKSTSTAYMELTSLRSEDTAVYYCARHDTNTVDADFIDWGGQ
 TMVTVSS

MF5708

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFRSYGITWVRQAPGQGLEWMGGIIPVECT
TNYAQKFEQGRVTITADKSTSTVFEMELNSLRSEDTAVYYCARRRCYSNPIHWLDPWGQ
 GTLVTVSS

Figura 3C

MF6629

QVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSNYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDSE
TRYSPSEFQQFTISADKSISTAYLQWSSLRASDTAMYYCATGWDFWGGQTLVTVSS

MF6630

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVVRQAPGQGLEWMGHIINPSGG
STNYAQKFEQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGCTMVRGVIDDWEDP
 WGQGTTLVTVSS

MF6637

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYPISWVRQAPGQGFEWMGGHPIEDTS
NIEQKFQGRVTLTADKSTSTVYMELSGLRSEDTAIYYCARVGGLRQAWYFDLWGRGT
 LVTVSS

MF6643

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYPMNWVRQAPGQGLEWLGWINTNTG
TPTYAHDEFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKSEDTAVYYCARGGWELLENYFQQWQQ
 GTLVTVSS

MF6645

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCSVSGGSISNRYWSWIRQSPGKGLEWIGYIYYSGNTN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKVNSTAAADTAVYYCASSPPYMDVWCKGTTVTVSS

MF6646

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAYMTWVRQAPGGGLEWVGRIRSKTD
GGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAIFYCTTGFDWYFTLWGRGT
 LVTVSS

MF6648

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQVPGKGLEWVGRIKSKTD
GGTTDYAAVAVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVFYCTTGCGYSGYGPEGED
 IWGQCTTVTVSS

MF6655

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGGHPIEDT
ANSAQNFQGRITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIGGTGTTDWYFDLWGR
 GTLVTVSS

MF6658

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYAISWVRQAPGQGLEWLGCHPIFGTS
NSAQNELGRVTITADKSTSTVYMELSSLRSEDTAIYYCARVGGYTSSSWFFDLWGRGT
 LVTVSS

MF6660

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFDTA
NYVPKEQGRVTTTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVDGGNSDWYFDLWGRGT
 LVTVSS

MF6675

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYPISWVRQAPGEGLEWMGGIPIFETA
NFAQKEFQGRVTTTADKSTNTVYMELSRRLSEDTAVYYCVRYDGRSSGCNWHFDLWG
 RCTLVTVSS

MF6686

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSYTTWVRQAPGQGFWMGGIPIFGTP
SYAQKEFQGRVTTTADKYTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYYFDSNGYPPEDDWG
 QGTLVTVSS

MF6690

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTRYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTTTG
NPTYAQCFTGRVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGWDFEEDSWGQGT
 LVT
 VSS

MF6692

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTDSSNAVSWVRQAPGQGFWMGGIPIFGT
ANYAQKEFQGRVTTTADKSTSTVNMELSRRLSEDTAVYYCARVGGLGTTPIHWYFDLW
 GRGTLVTVSS

MF6700

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSTNAISWVRQAPGQGLEWMGGIVPILDT
VNYAQNFLGRVTTTADRATRtayMELTNLRSEDTAVYYCAIPSYNWNRLYYYMDVW
 GKGTTVTVSS

MF6706

QITLKESGPTLVRPTQTLTLCTFSGFSLSTSAVGVDWIRQPPGKALEWLALIYWSDD
KRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMNMDPVDATYYCARSQPNLDEWSGYHFDY
 WGQGTLVTVSS

MF6714

EVQLVQSGAEVKKSCSSVKVSCEASGGSFNSYTTTWMRQAPGQGLEWMGGIIPFGT
ASYAQKFQGRVTITADRSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPFYDRSGYPPFDYW
 GQGTLVTVSS

MF6721

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTD
GGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTKGWGSQWCGQTLV
 TVSS

MF6722

QVQLVQSGAGVKEPGSSVKVSKTSGDTFSSYAISWLRQAPGQGLEWMGGIPIEDTA
NSDQKFQDRVTITADRSTNTVYMELSSLRSDDTAVYYCARVGCYGNYNFDYWQQC
 TLVTVSS

MF6724

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTD
GGTTDYASPVKGRFTISRDDSKNTLYLHLNSLKTEDTAVYYCTTDPGSGSYFYHYMD
YWGKCTLVTVSS

MF6728

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSAVGVGWIRQPPGKSLEWLAVIYWSDD
KRYSPSLKSRLTTTKDTSKNQVVLRTNMDPVDATYYCAHRRPNYDSWSGYYEDY
 WGQCTLVTVSS

MF6729

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKKASGYTFTSHVMNWVRQAPGHGLEWMGWIDTNT
GNPTYAQDFTGRFVFSLDSSVSTAYLQISSLKTEDTAVYYCARGGWGLLREYFLQWG
 QGTLVTVSS

MF6826

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISFDGTN
EYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKAEDTAVYYCATITGHIYSGFDYWQGCTL
 VTVSS

MF6940

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSDYPISWVRQAPGQGF~~EW~~MGGLPIFDTS
NIEQKFQGRVTLTADKSTSTVYMEISGLRSED~~TAIYYCARVDGTGISN~~WYFDLWGRG
TLVTVSS

MF6942

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFESSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWIN~~TNT~~
GNPTYAQGF~~TGRFV~~SLDTSVSTAYLQISGLKAEDTAVYFCTR~~GYSSIWH~~GENFQYW
GQGTLVTVSS

MF6943

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTGYAINWVRQAPGQGLEWMGWINT~~NTG~~
NPTYAQDFTGRFVFSVDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDMDNWN~~YEGYYMD~~
YWGKGTITVTVSS

MF6944

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCRASGGTFSNYAISWVRQAPGQRLEWMGGLPIFD~~TA~~
NSAQTEQDRVTITADTSTSTVYMEISLKSSED~~TAVYYCARVEGWGSQWY~~FDLWGRGT
LTVTVSS

MF6947

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNNYPISWVRQAPGQGLEWMGTHIPIFD~~TS~~
SSAQQFQGRVTITADESTNTVSMELSSLRSED~~TAIYYCARVEGTDSNWGWDFW~~GQGT
LTVTVSS

MF6949

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAVNWVRQAPGQGLEWMGWINTD~~TG~~
NPTYAQGF~~TGRFV~~SLDTSVNTAYLQINSLKPEDTAVYYCARD~~DDGTGTGDYVWGRYR~~
YTLDEWGQGT~~L~~VTVSS

MF7331

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAY~~NG~~
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD~~DTAVYYCARDGYKLYAADGF~~DYW
GQGT~~L~~VTVSS

MF7332

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDMDSYPFYRGFDYW
 GQGTLVTVSS

MF7334

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDDNTMWYSRPAFD
YWGQGTLVTVSS

MF7341

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYNG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDSPYWSLPGGFDYW
 GQGTLVTVSS

MF7345

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQRWWYMDPGAGF
DYWGQGTLVTVSS

MF7350

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAKDYSYSGTCSSSAFDY
 WGQGT

MF7351

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYLHICSYRCSAFDY
 WGQGT

MF7352

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDSWHGQYYYGKGF
YWGQGTLVTVSS

MF7353

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGLGWDPGYGFDYW
 GQGTLVTVSS

MF7356

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNYQGMYYEETGFD
 YWGQGTSLVTVSS

MF7358

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDNHYYSPPTYWGFED
 YWGQGTSLVTVSS

MF7365

EVQLLESQGGLVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKCGQSQYHSYPFGFDYW
 GQGTLVTVSS

MF7366

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWWQGHWYRSGGF
 DYWGQGTSLVTVSS

MF7371

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGQMDYYDDWYSAFD
 YWGQGTSLVTVSS

MF7372

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYQGSHYFGPAFDY
 WGQGTSLVTVSS

MF7374

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDDNRMYSNPKGFD
YWGQCTLVTVSS

MF7378

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNTQCNYR SRGFD
YWGQCTLVTVSS

MF7382

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGLQCSNYHLGCFD
YWGQCTLVTVSS

MF7383

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISCSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGYD MYGGWGA WGFEDY
WGQCTLVTVSS

MF7394

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASCYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG
NTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDYPAWAYS AFDYWG
QCTLVTVSS

MF7395

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDYWYYLSDAFDYWG
QCTLVTVSS

MF7397

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISCSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHWGSEYGFEDYWGQ
CTLVTVSS

Figura 3D

MF5554

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSHAMNWVRQAPGQGLEWMGWINPNT
GNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDF
QHWCGTLTVSS

MF5576

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSHAMNWVRQAPGQGLEWMGWINPNT
GNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAIDRGYMSNWVFAEYFP
HWGQGTTLTVSS

MF5578

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNT
GNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCATDRGYISSWVFAEDFQ
HWGQGTTLTVSS

MF7702

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAINWVRQAPGQGLEWMGWINPNTG
NPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDFQ
HWGRGTLVT

MF9375

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAMNWVRQAPGQRLEWMACYNPNTG
SPTYAQGSGTGRFVVSIDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDFQH
WGHGTLTVSS

MF9376

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGWMNPNT
TGNTPTYAQGSGTGRFVVSIDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDRKYVTNWVFAEDF
QHWCRGTLTVSS

Figura 4

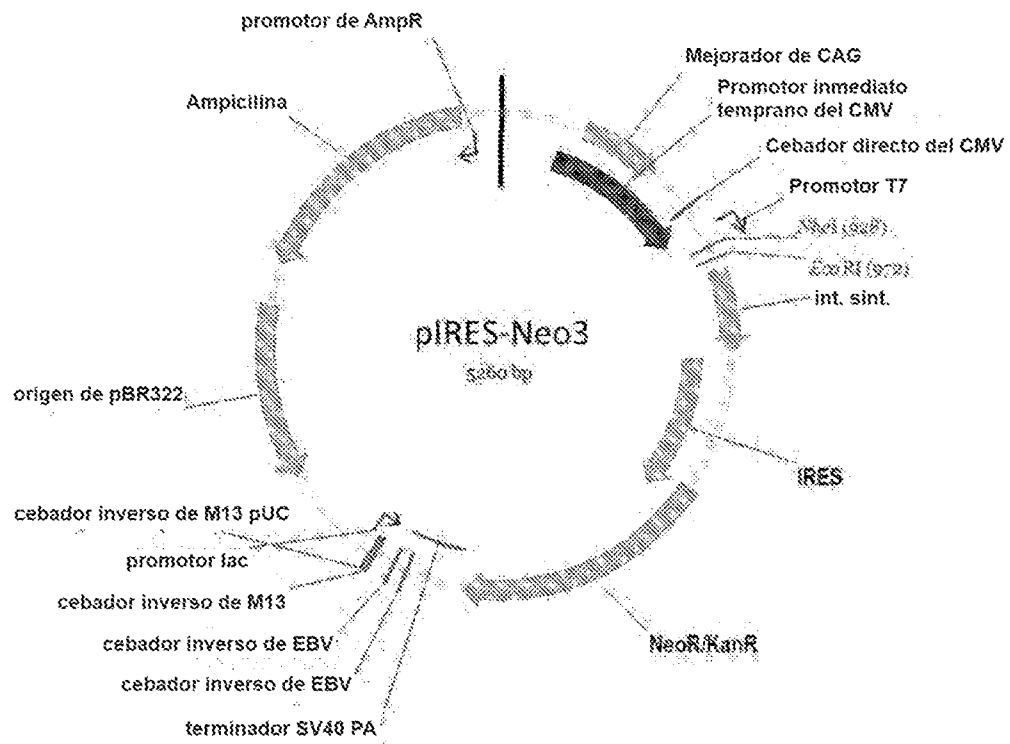


Figura 5

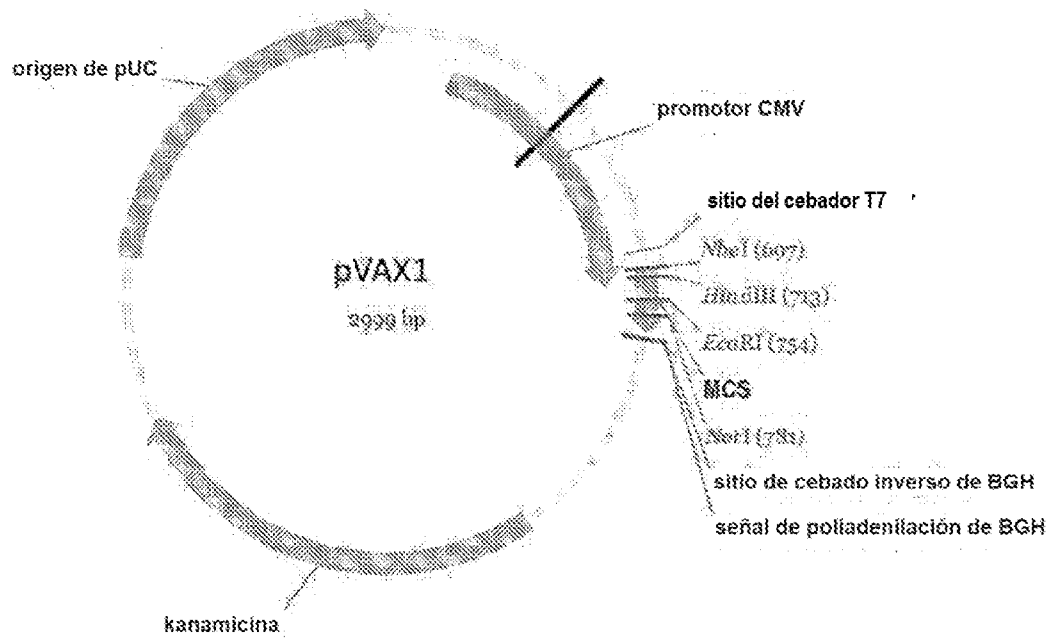


Figura 6

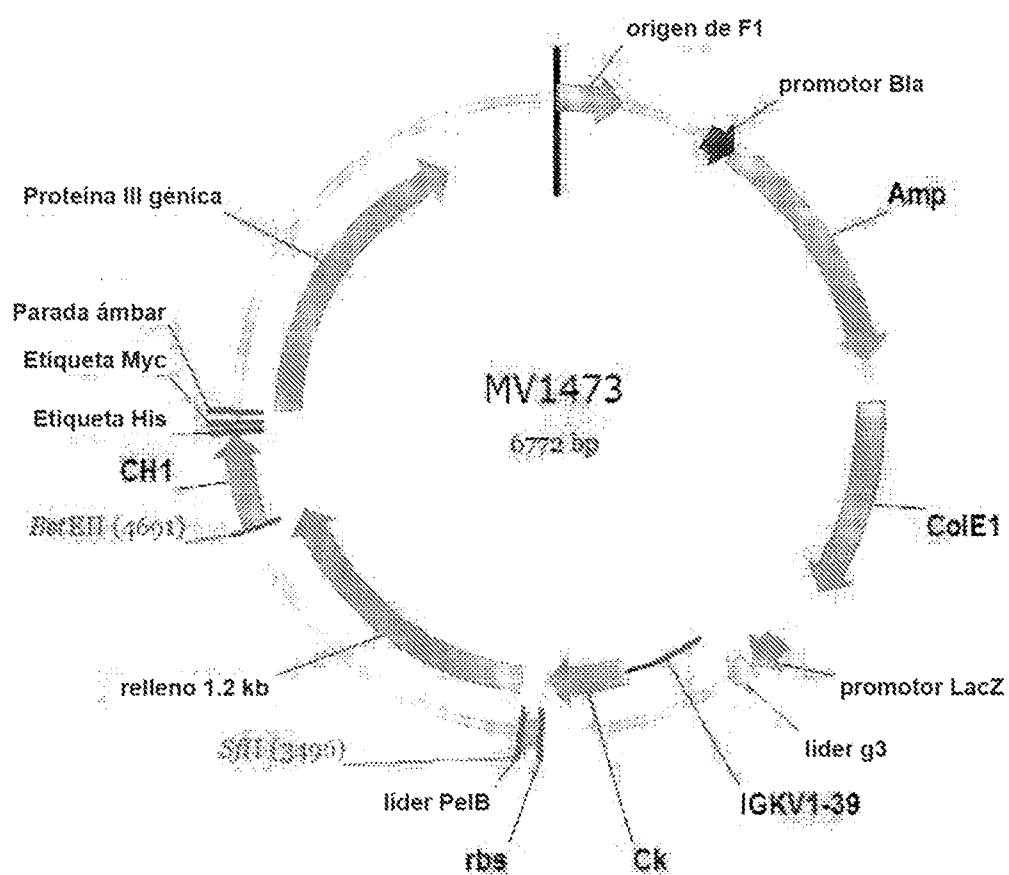


Figura 7

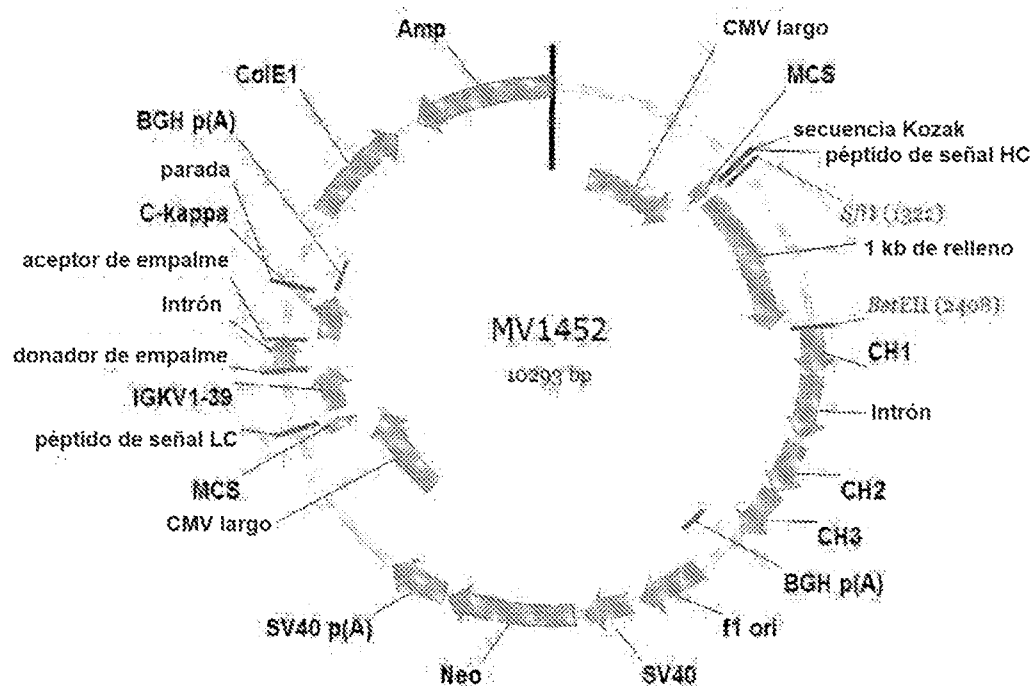


Figura 8

EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASDYI^{FTKYD}INWVRQAPGQGLEWMGWSANTGNTGYAQKFGQGRVTMTPTDS
INTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSS^{LEKTE}TETAPYYHFALDYWGQGTFTVTVSS

Figura 9

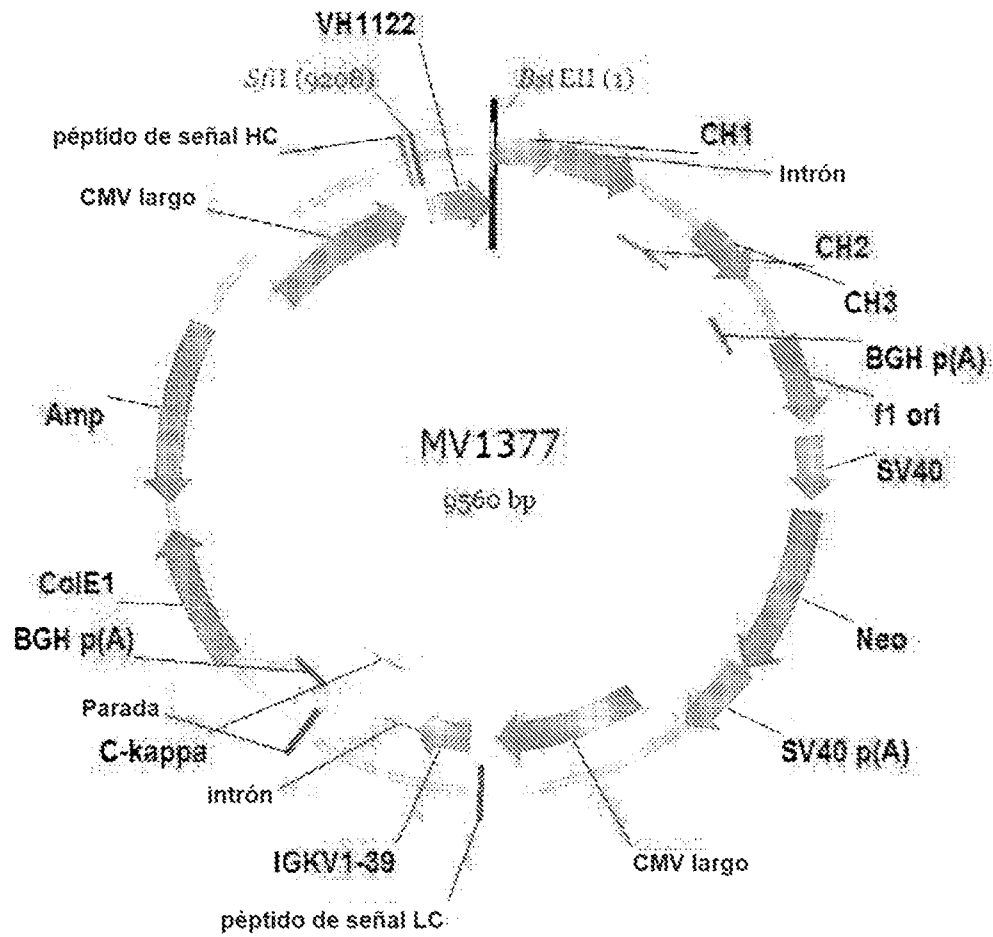


Figura 10

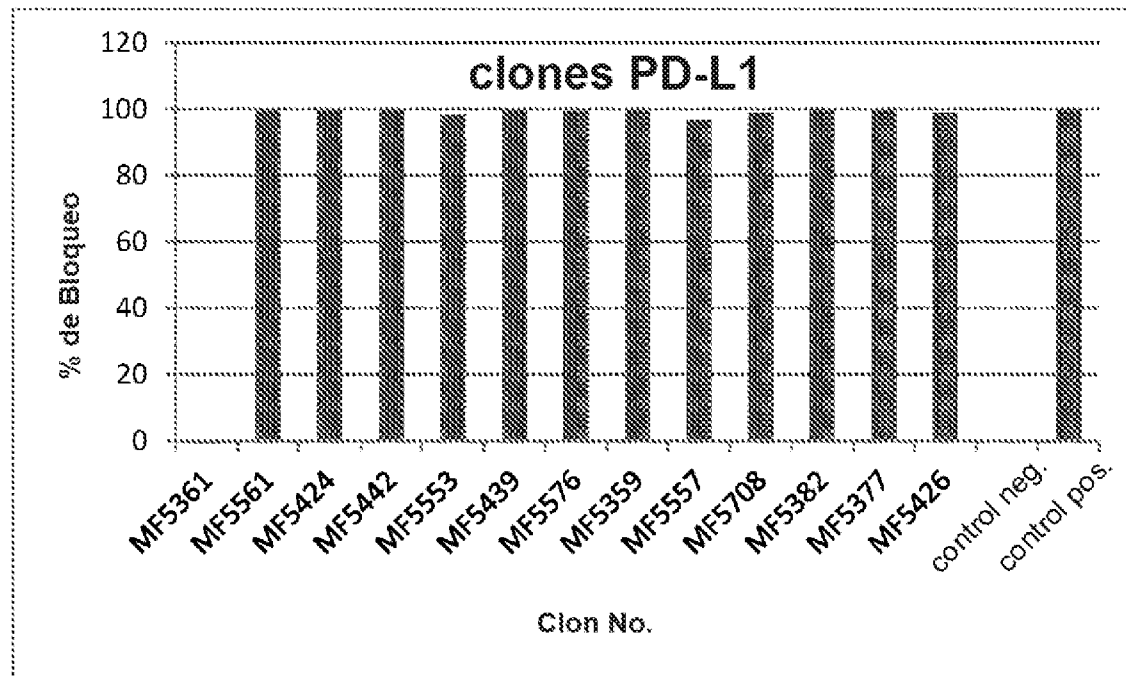


Figura 11

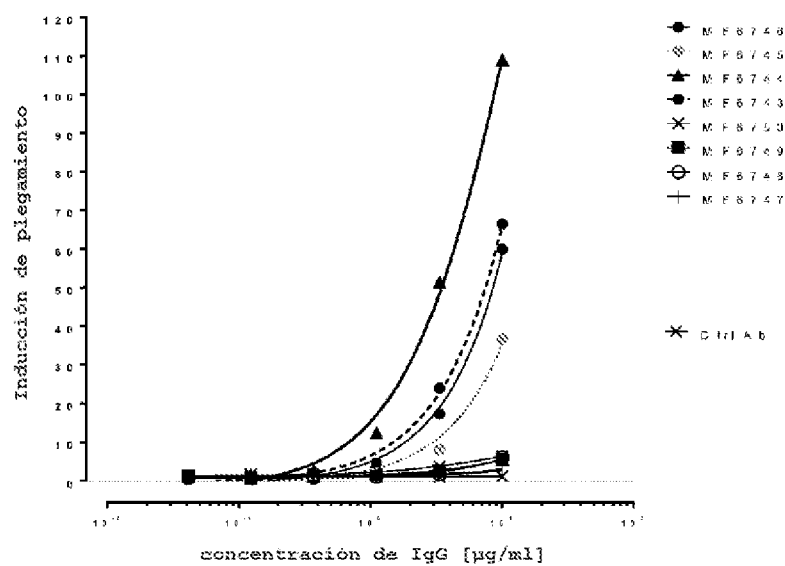


Figura 12

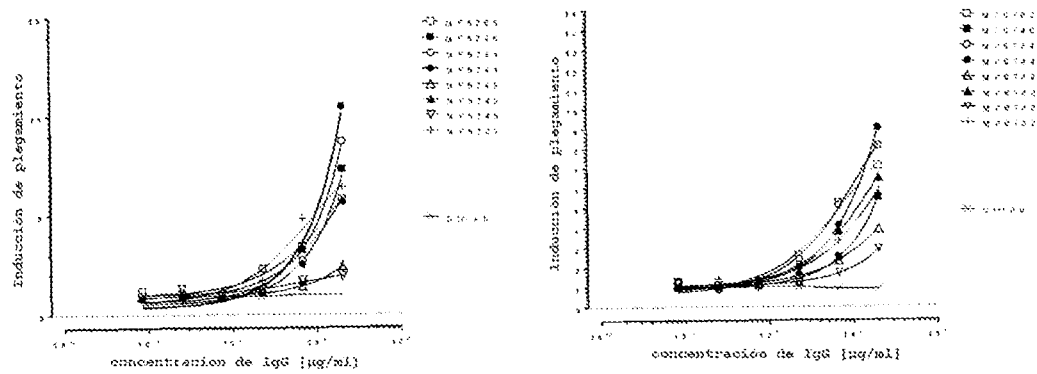


Figura 13

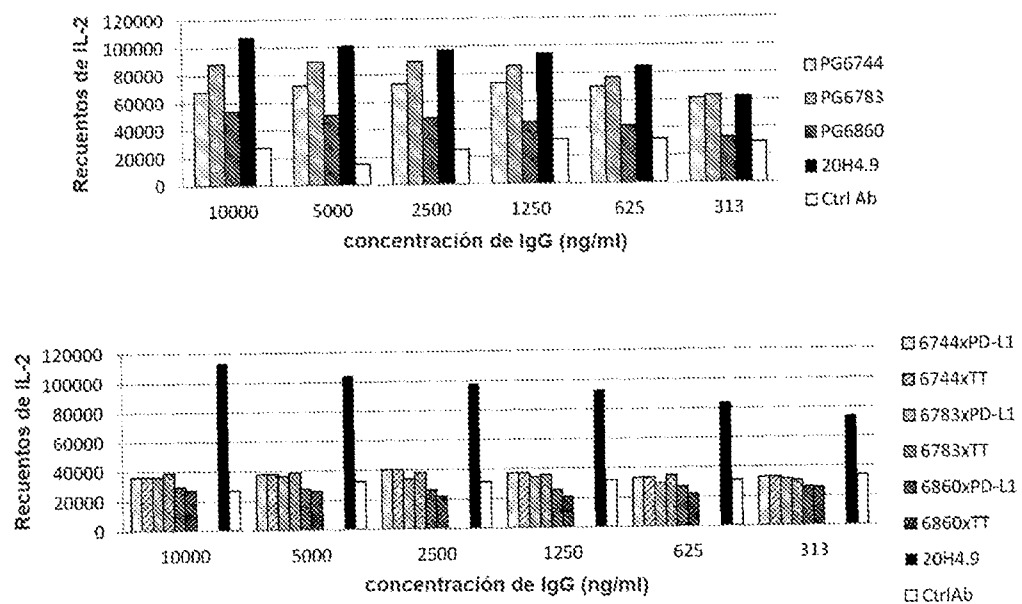
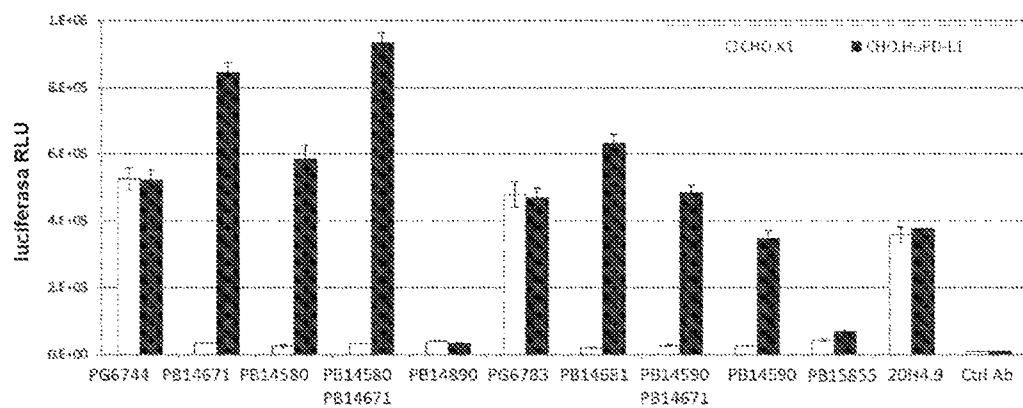
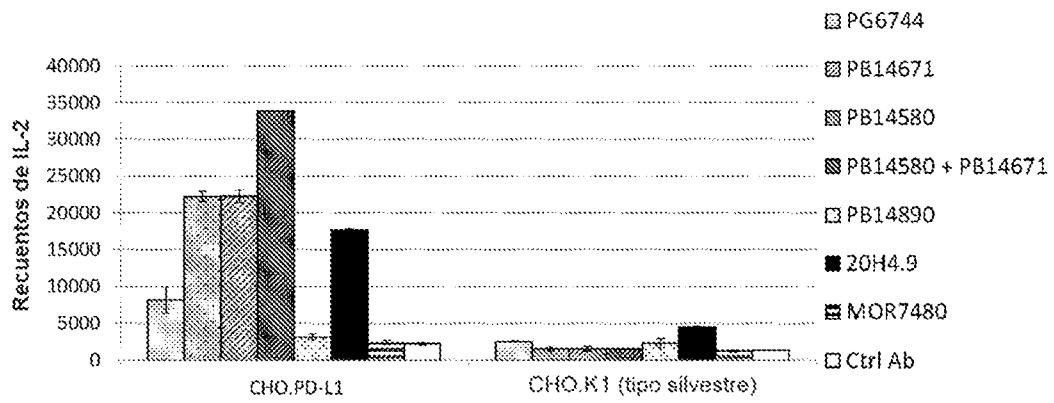


Figura 14



PB/PG	Brazo diana #1	MF	Brazo diana #2	MF	Brazo diana #3	MF	Brazo diana #4	MF
PG6744	CD137	6744	CD137	6744	NA	NA	NA	NA
PB14671	PD-L1	5361	CD137	6744	NA	NA	NA	NA
PB14580	PD-L1	5594	CD137	6744	NA	NA	NA	NA
PB1480/PB14671	PD-L1	5594	CD137	6744	PD-L1	5361	CD137	6744
PB14890	TT	1337	CD137	6744	NA	NA	NA	NA
PG6783	CD137	6783	CD137	6783	NA	NA	NA	NA
PB14681	PD-L1	5361	CD137	6783	NA	NA	NA	NA
PB14590	PD-L1	5594	CD137	6783	NA	NA	NA	NA
PB14590/PB14671	PD-L1	5594	CD137	6783	PD-L1	5361	CD137	6744
PB15855	TT	1337	CD137	6744	NA	NA	NA	NA
20H4.9	CD137	NA	CD137	NA	NA	NA	NA	NA
Ctrl Ab	TT	1337	TT	1337	NA	NA	NA	NA

Figura 15



ID	Brazo diana #1	Brazo diana #2	Brazo diana #3	Brazo diana #4
PB14135	CD137	CD137		
PB14671	CD137	PD-L1 (A)		
PB14580	CD137	PD-L1 (B)		
PB14580 + PB14671	CD137	PD-L1 (A)	CD137	PD-L1 (B)
PB14890	CD137	IT		
20H4.9	CD137	CD137		
MOR7480	CD137	CD137		
Ctrl	IT	IT		

Figura 16

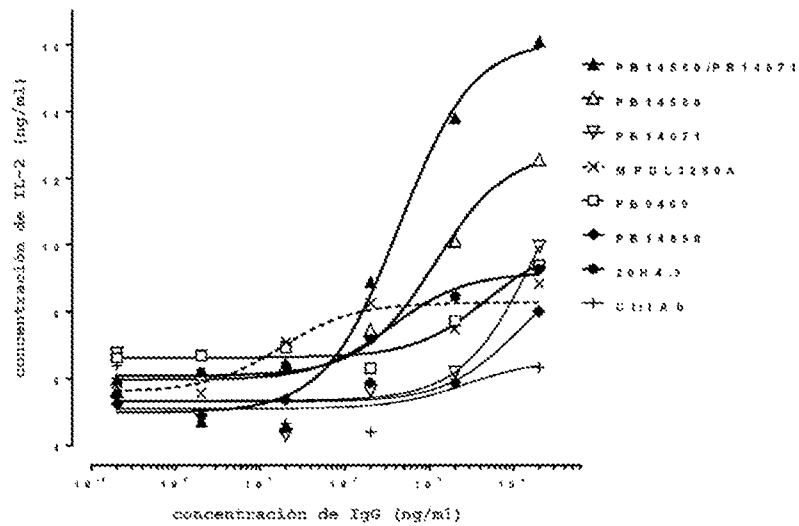


Figura 17

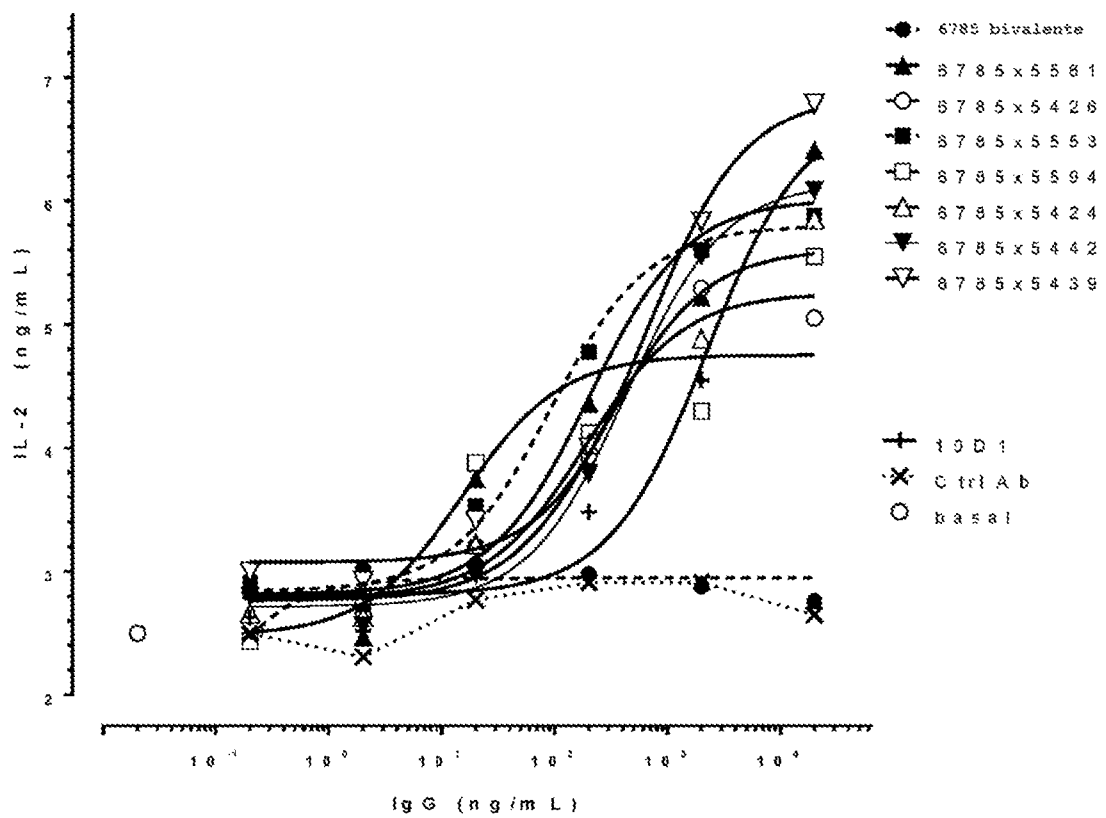


Figura 18

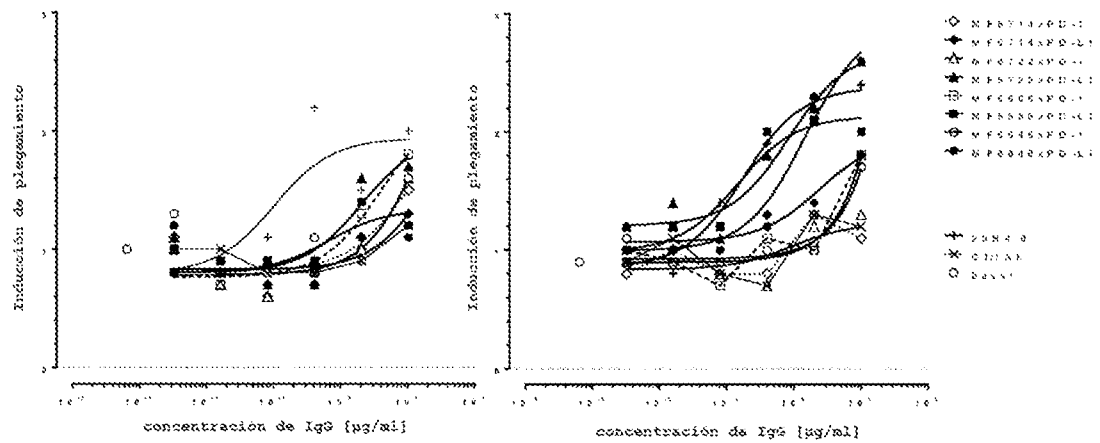
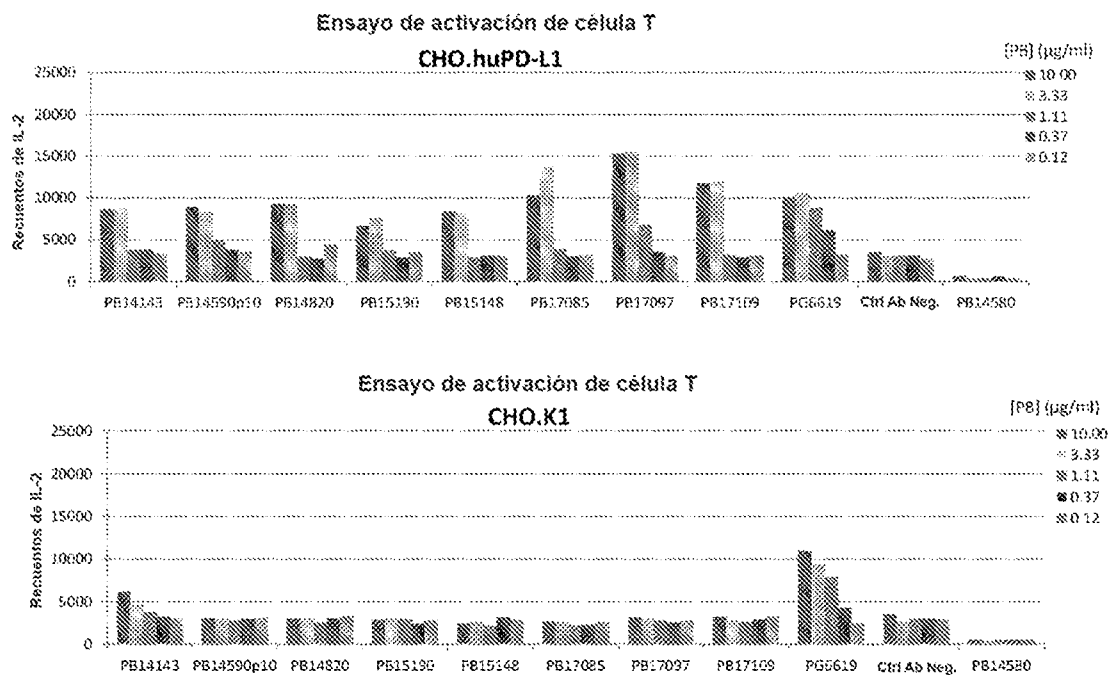
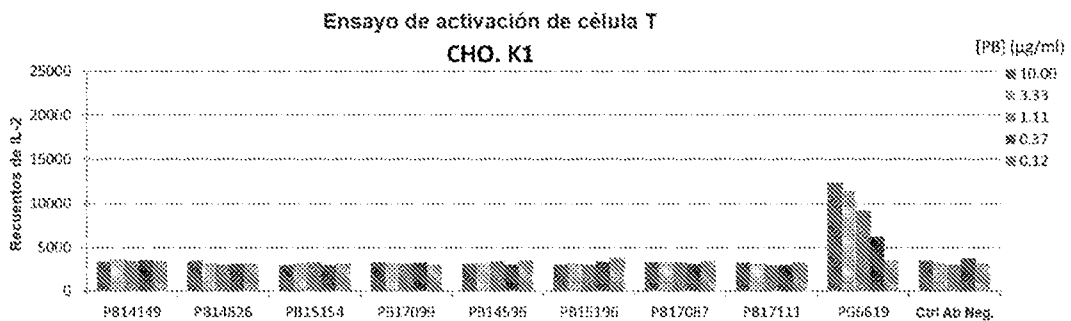
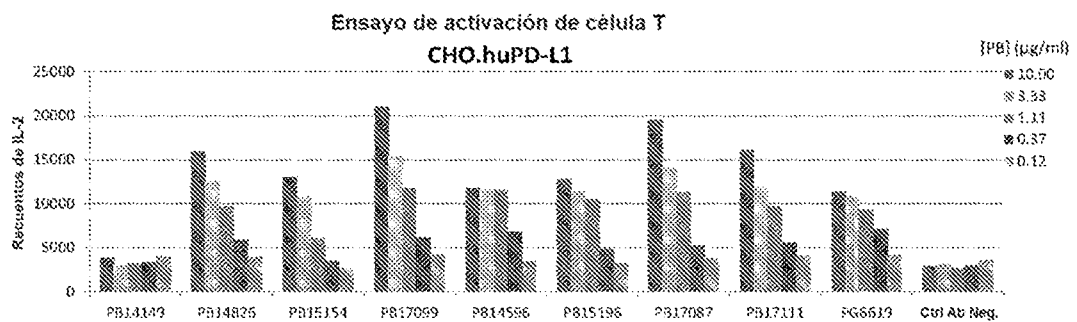
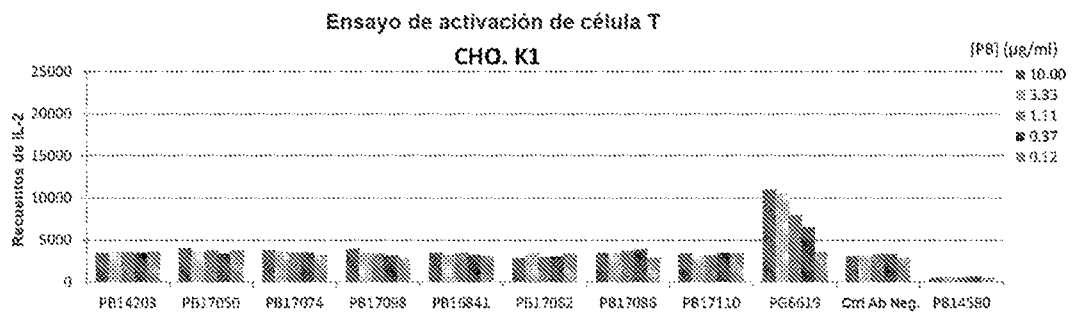
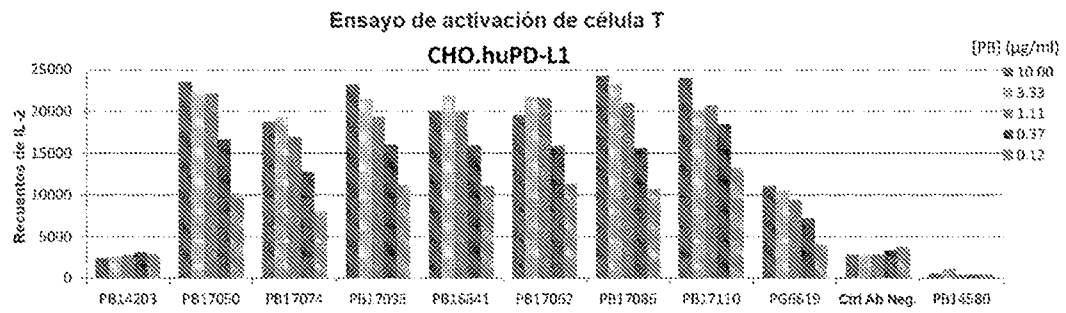
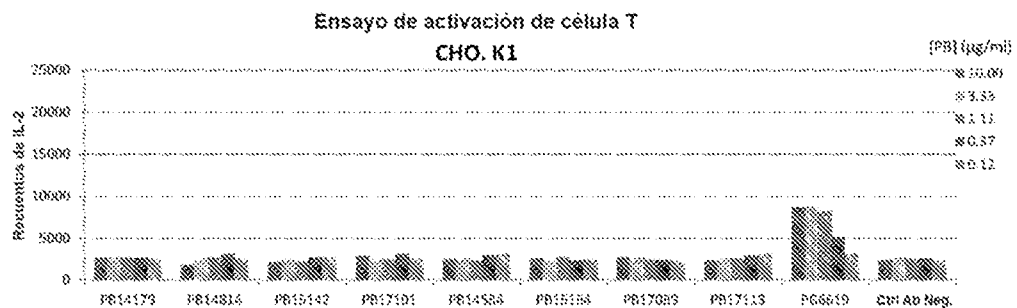
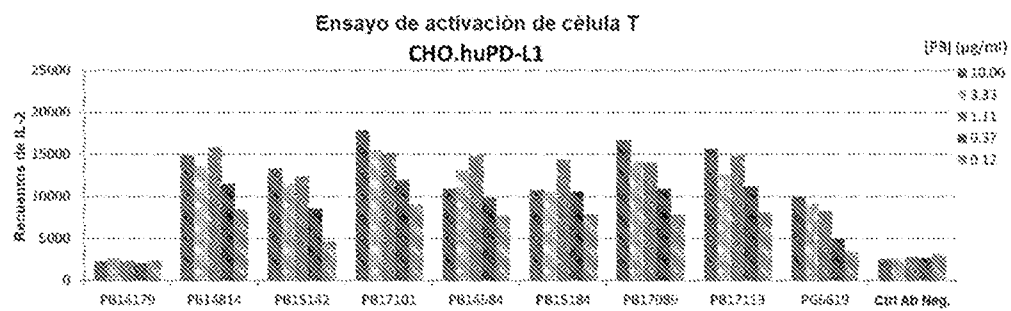
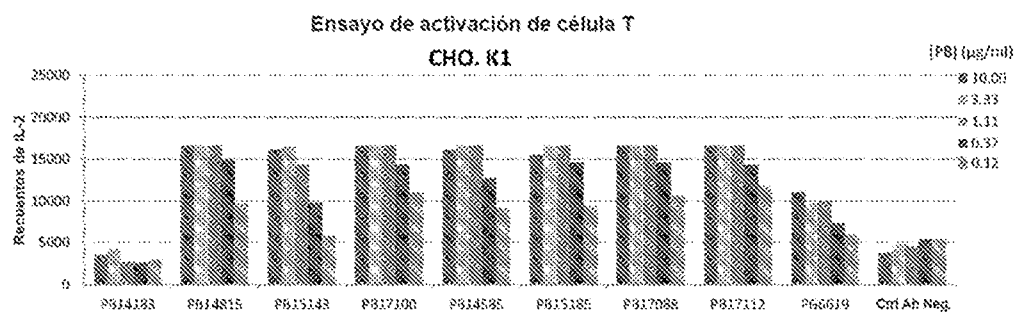
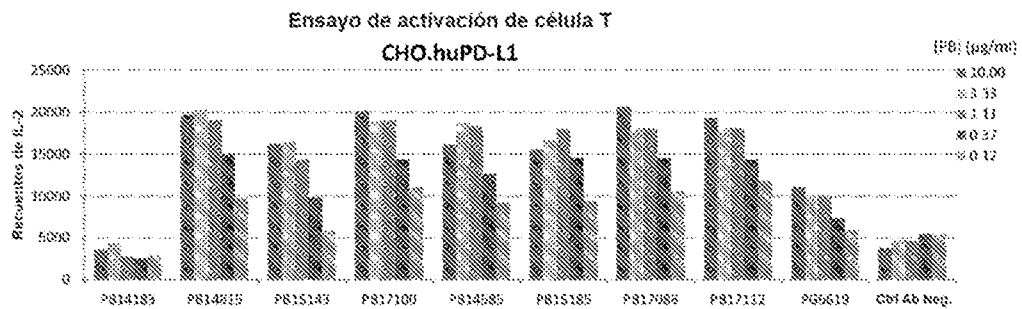
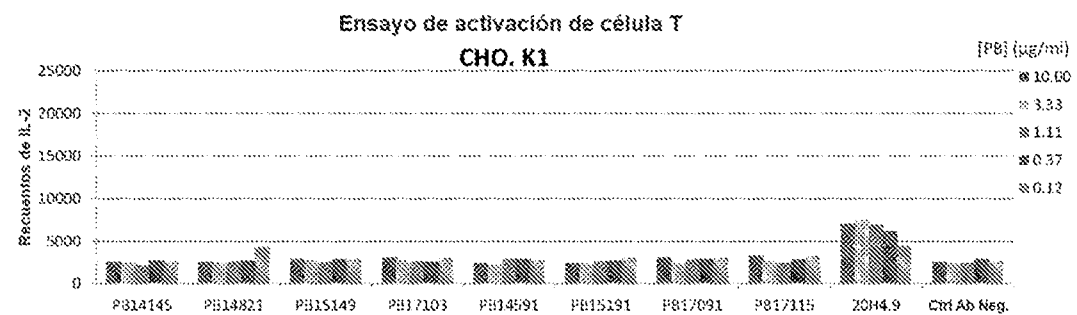
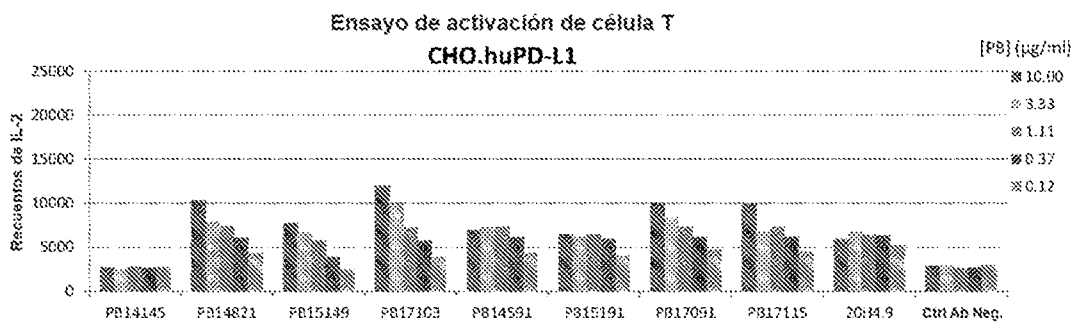
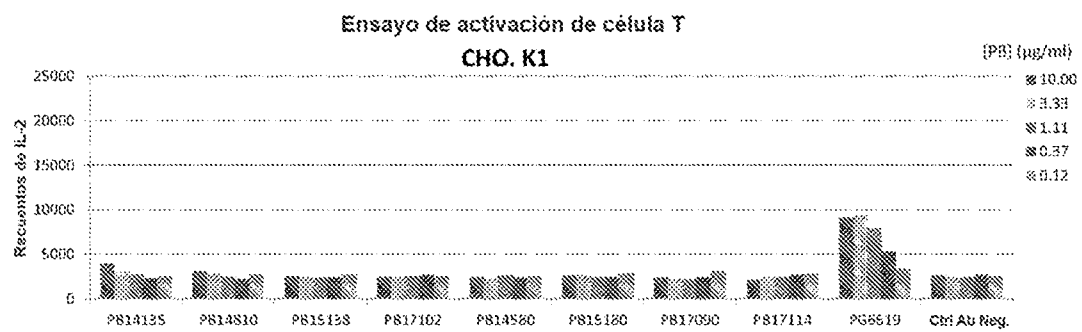
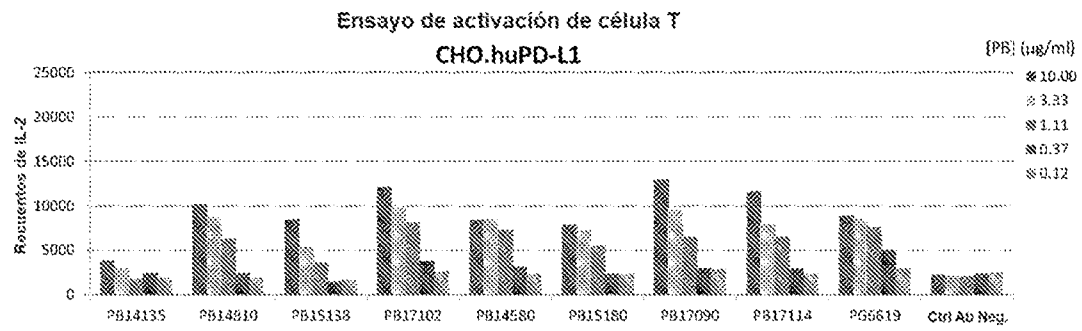


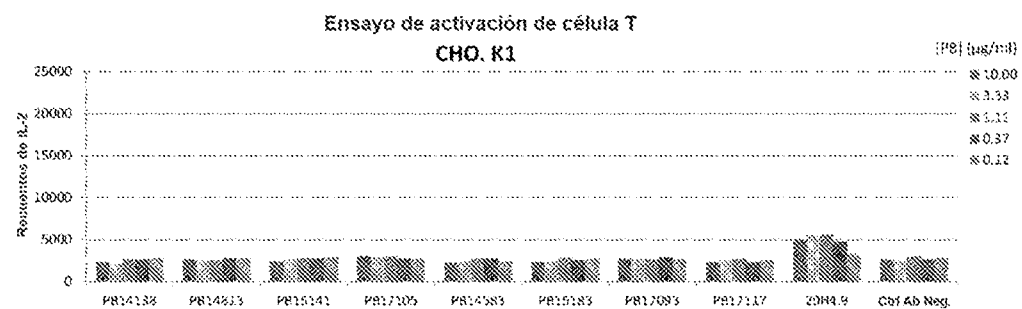
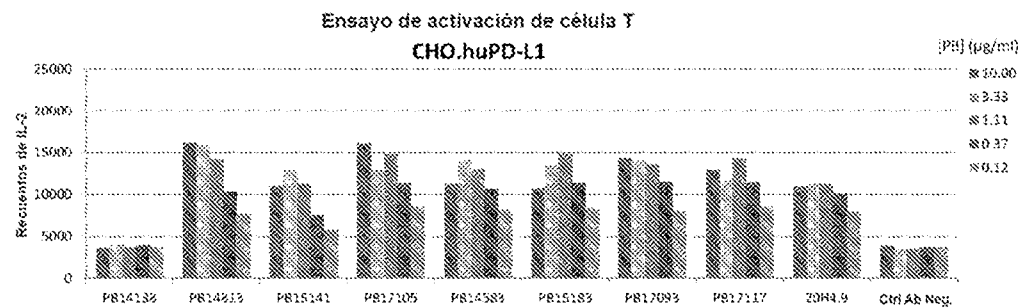
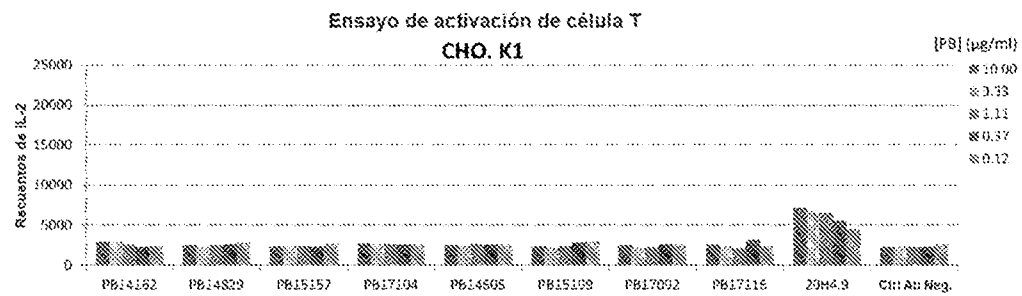
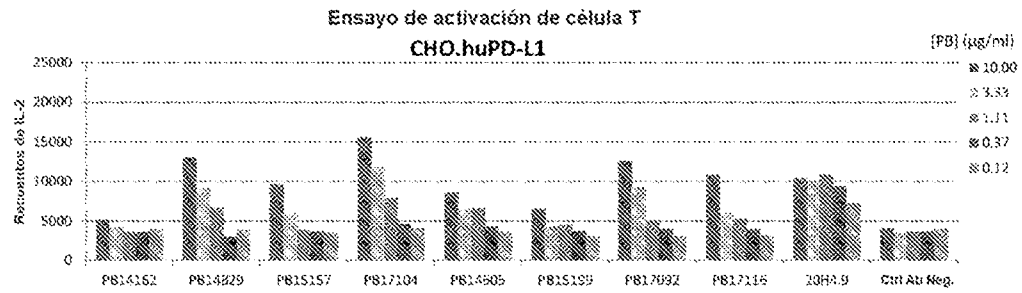
Figura 19

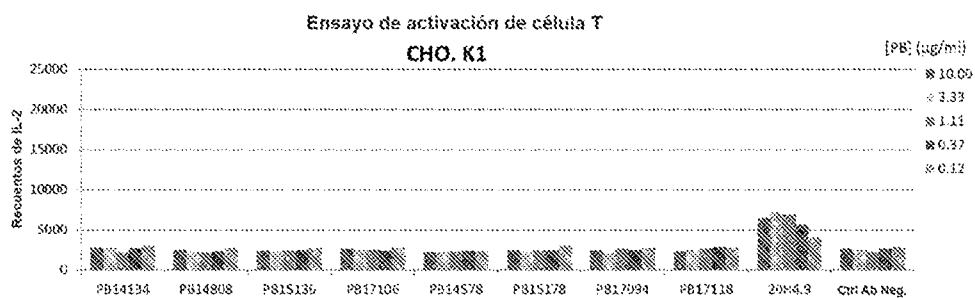
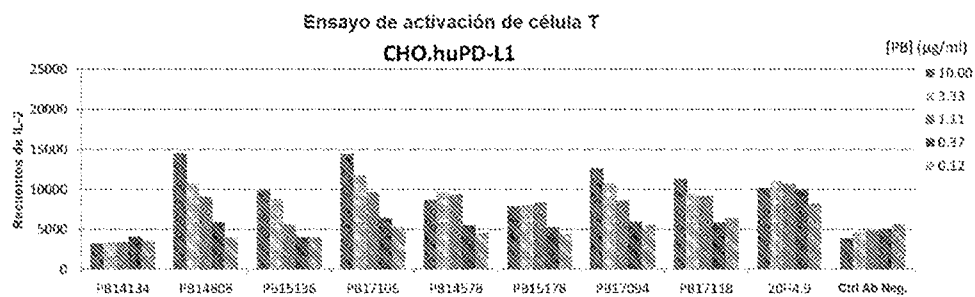












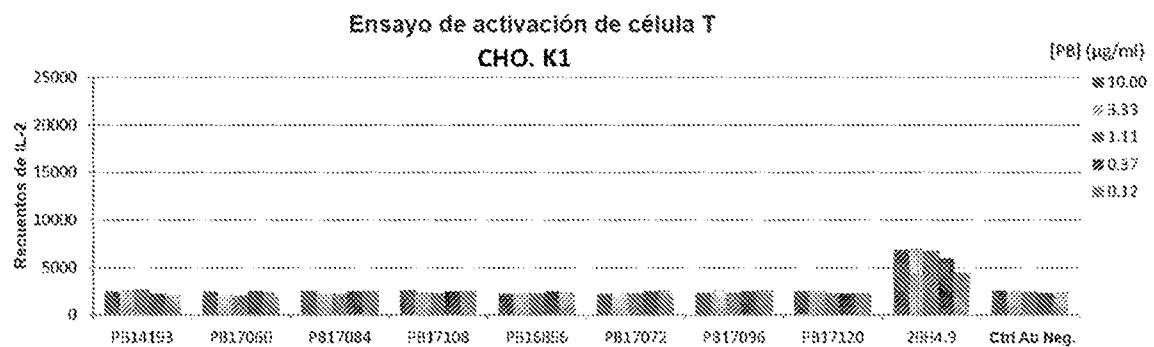
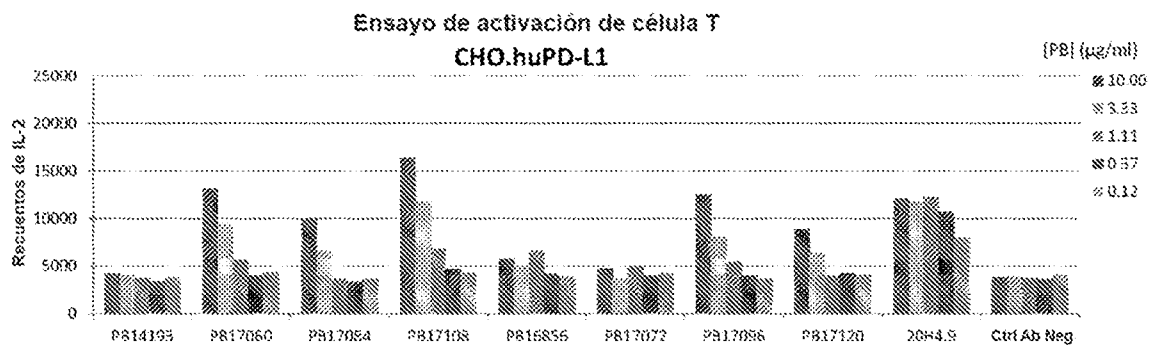
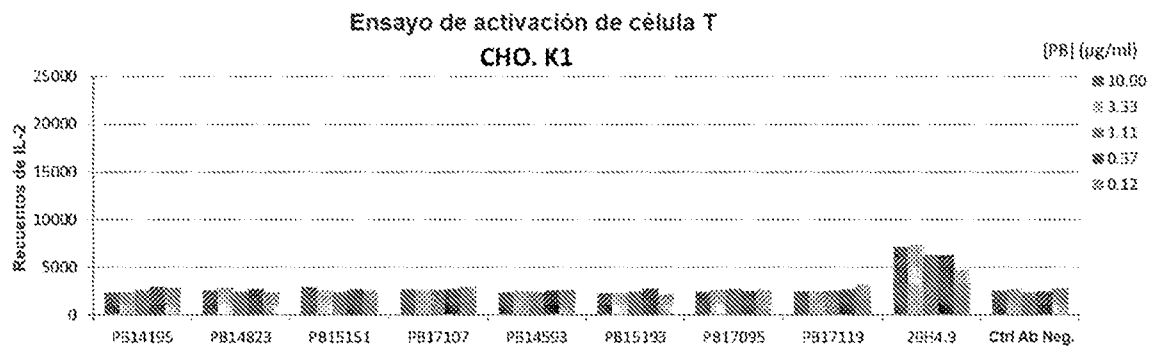
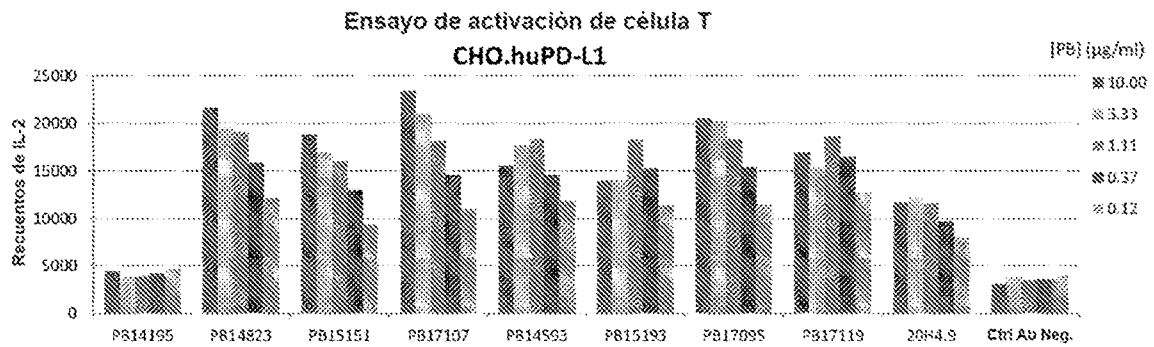
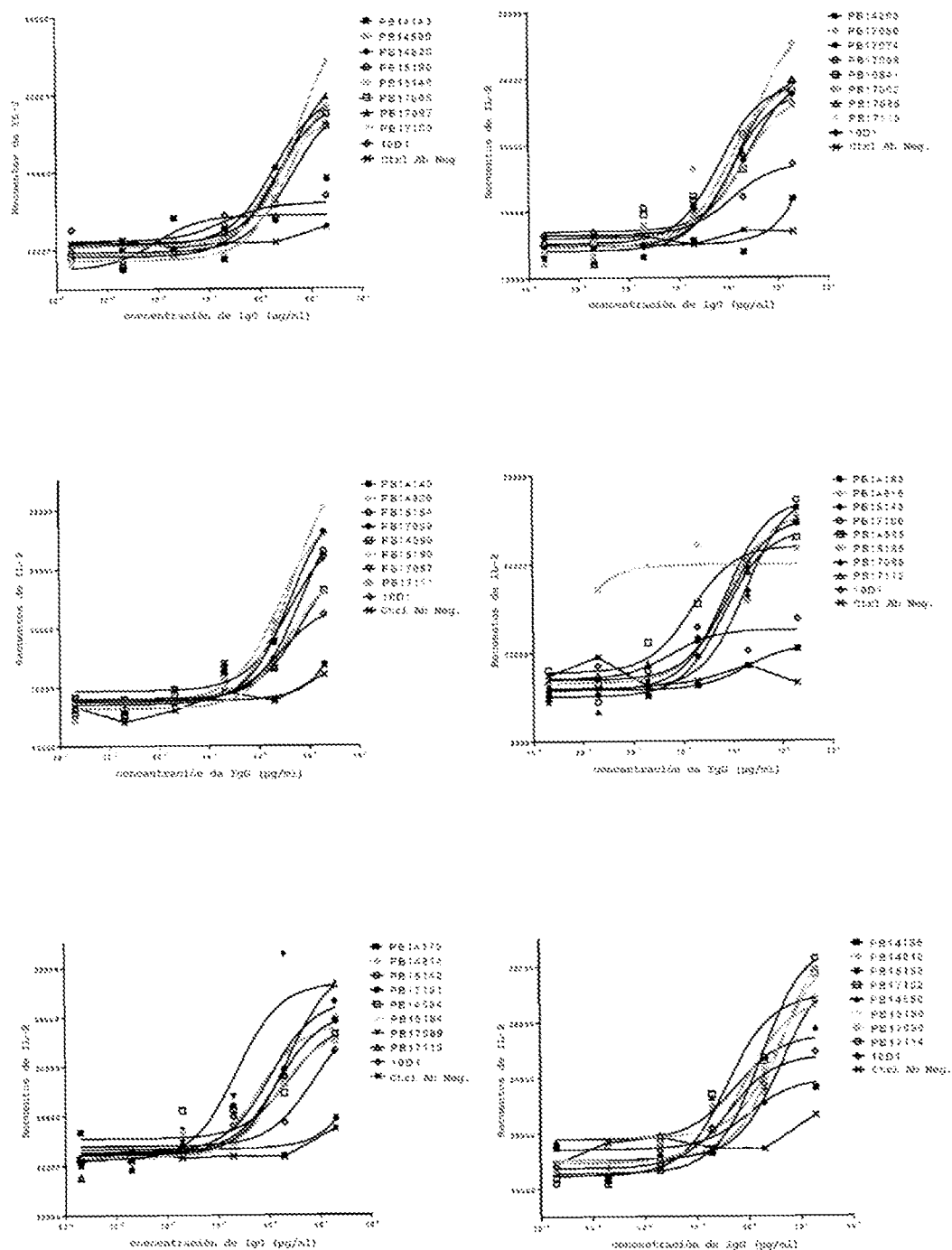


Figure 20



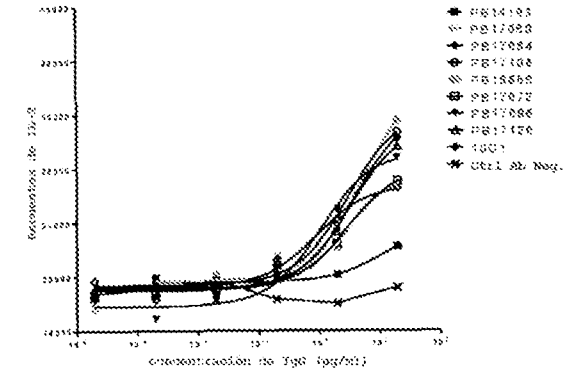
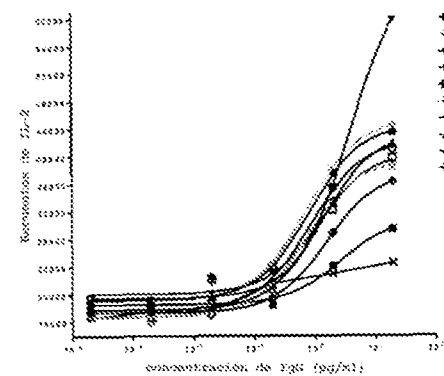
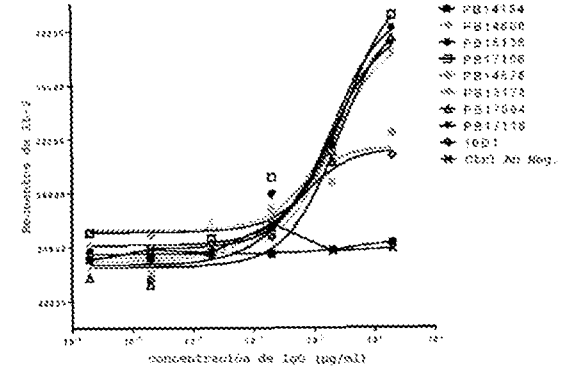
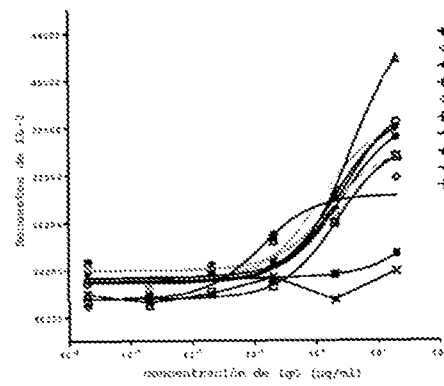
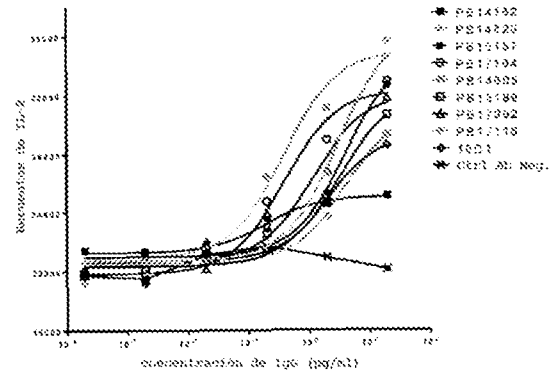
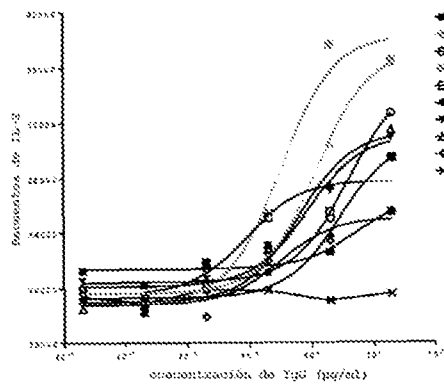


Figura 21

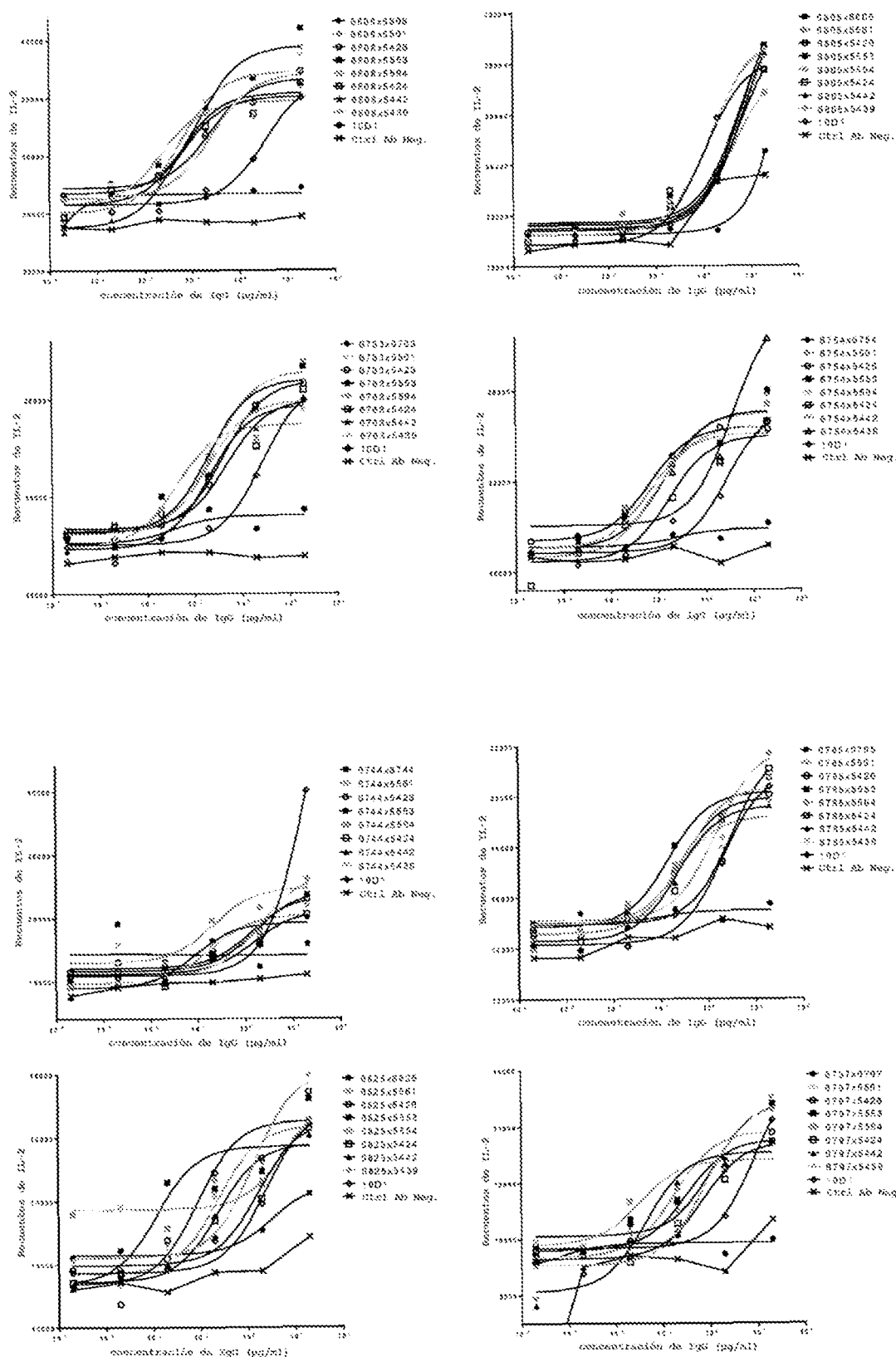


Figura 22

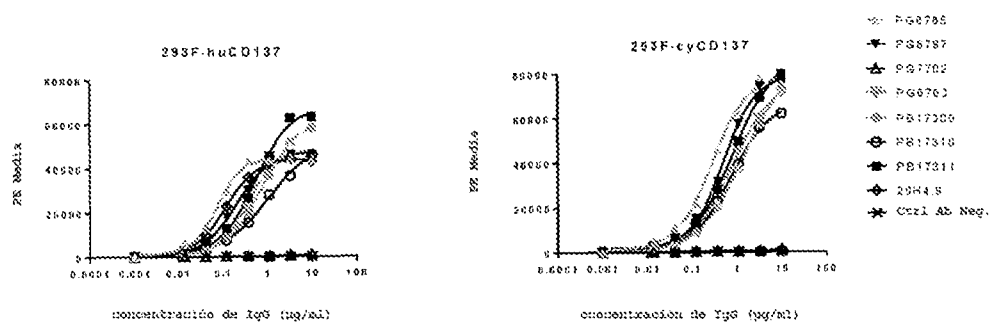


Figura 23

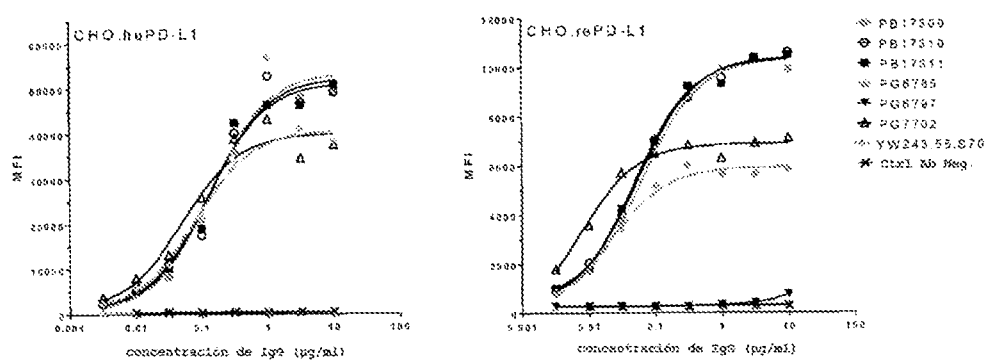


Figura 24

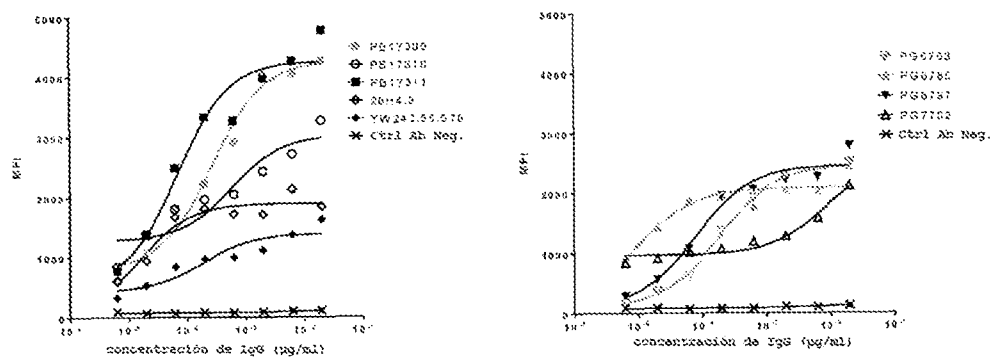


Figura 25

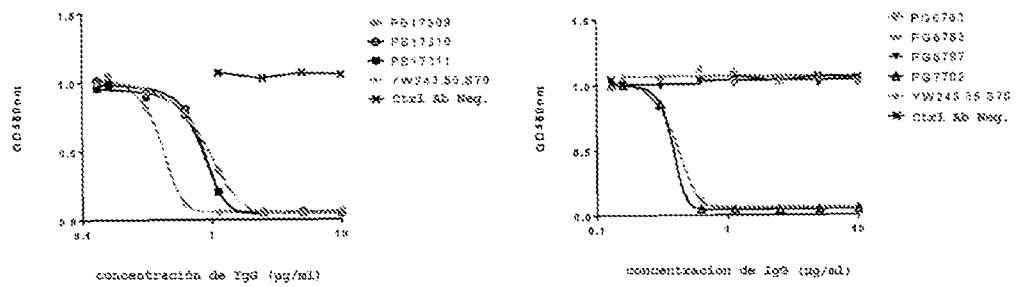


Figura 26

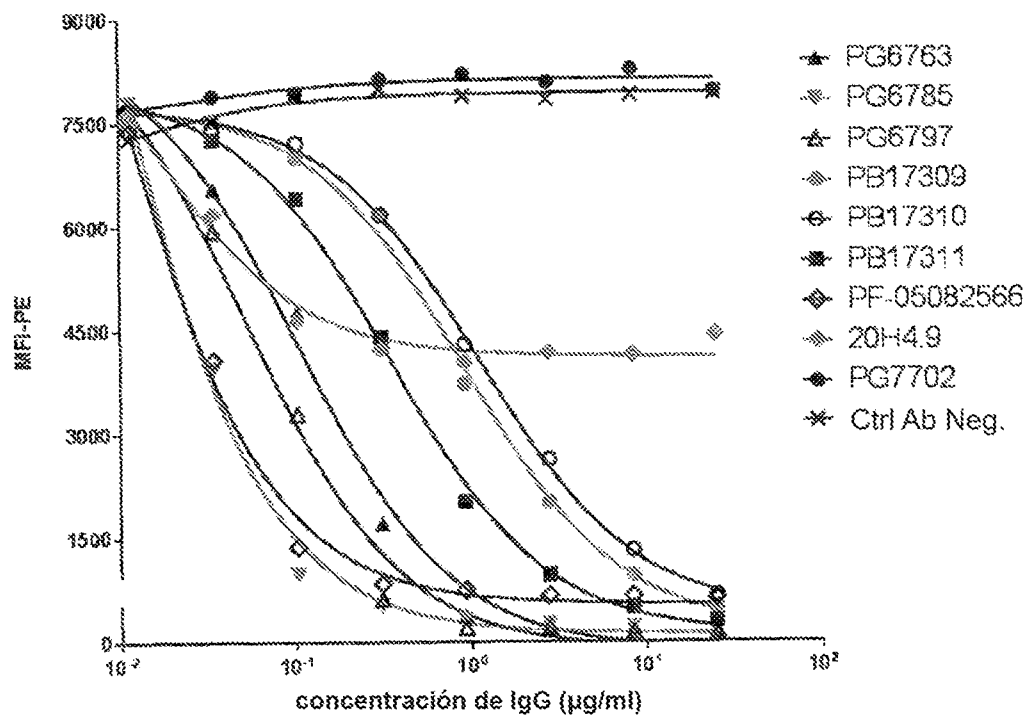


Figura 27

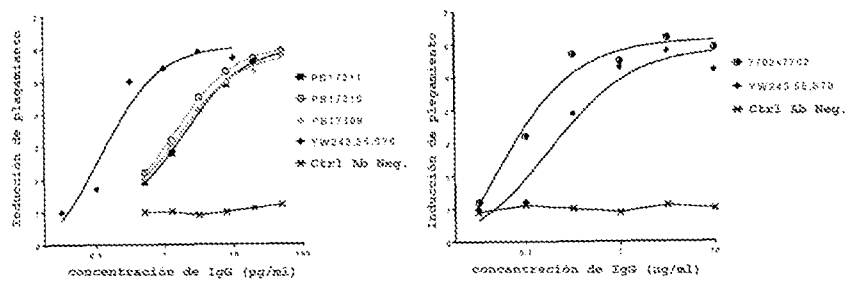


Figura 28A

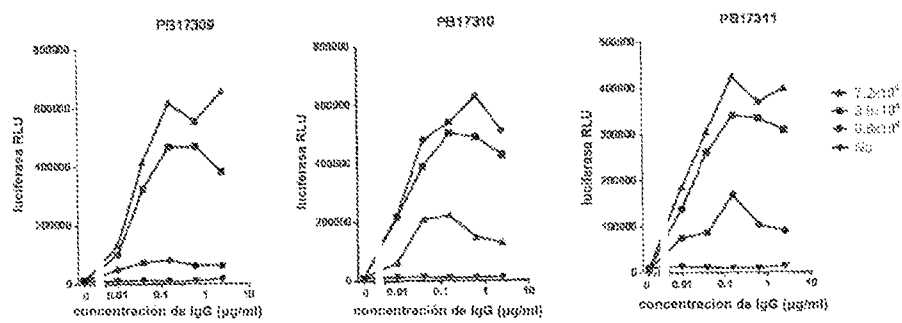


Figura 28B

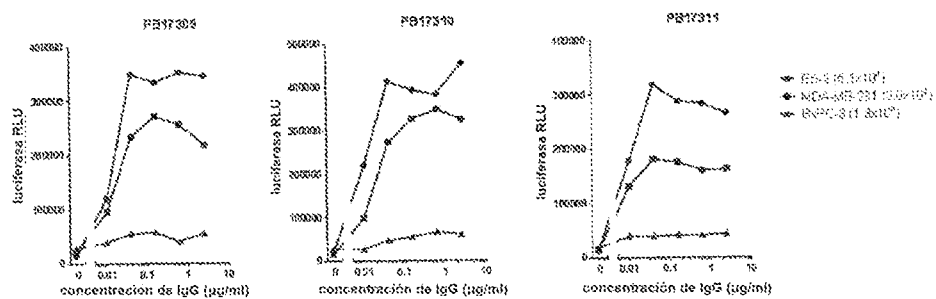


Figura 28C

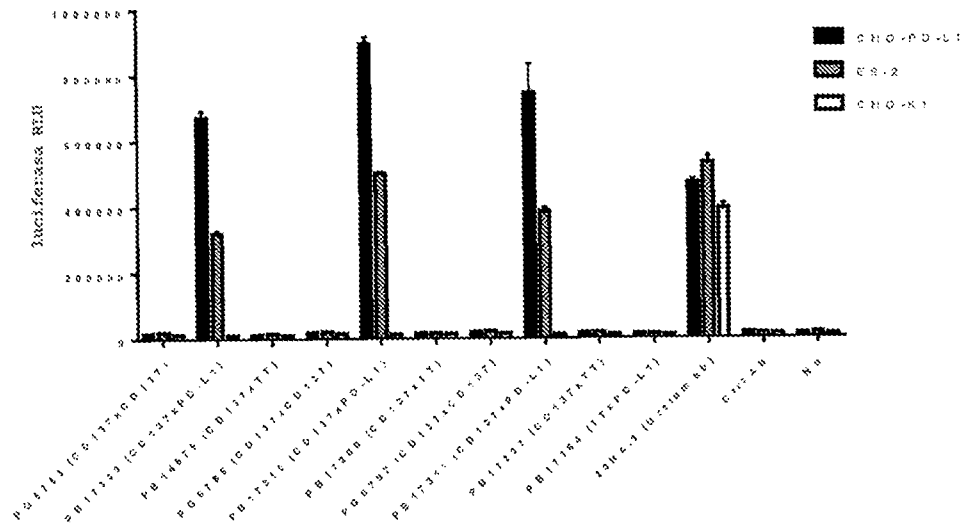


Figura 29

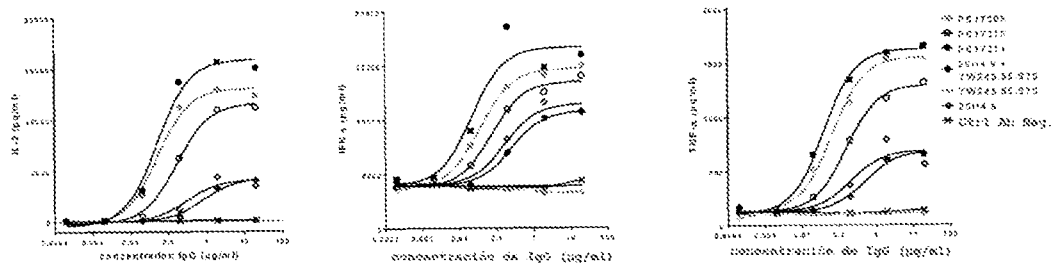


Figura 30

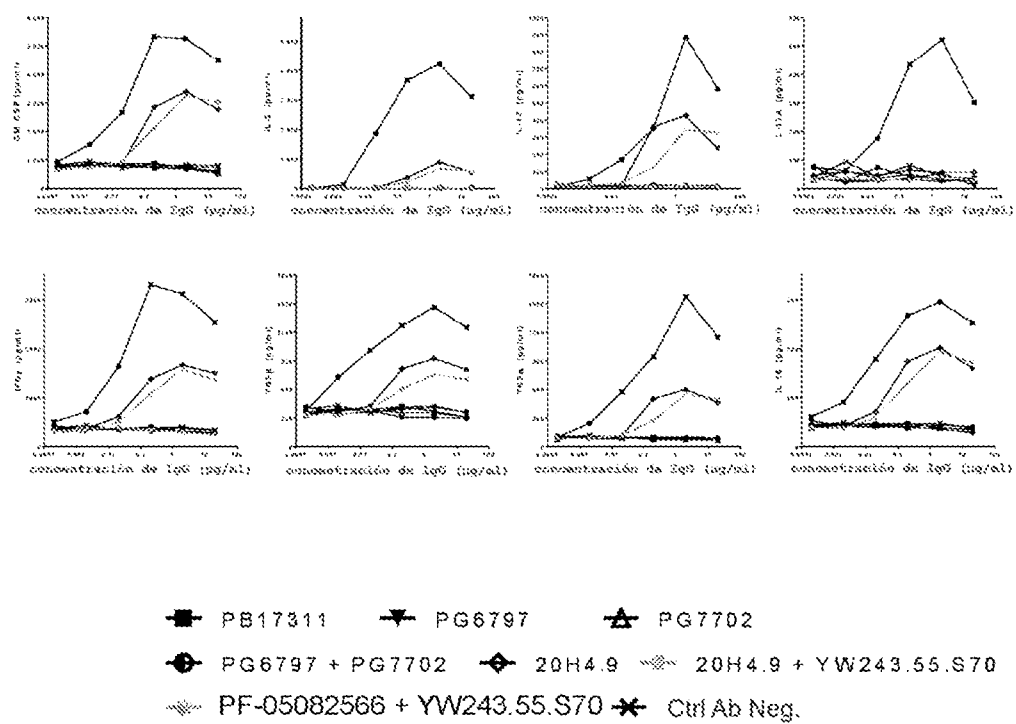


Figura 39 continuación

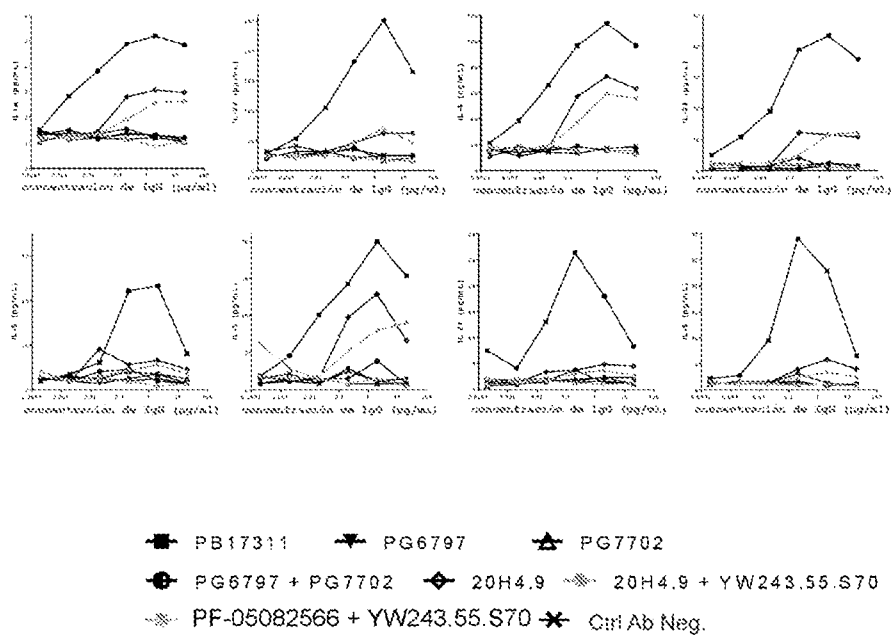


Figura 31

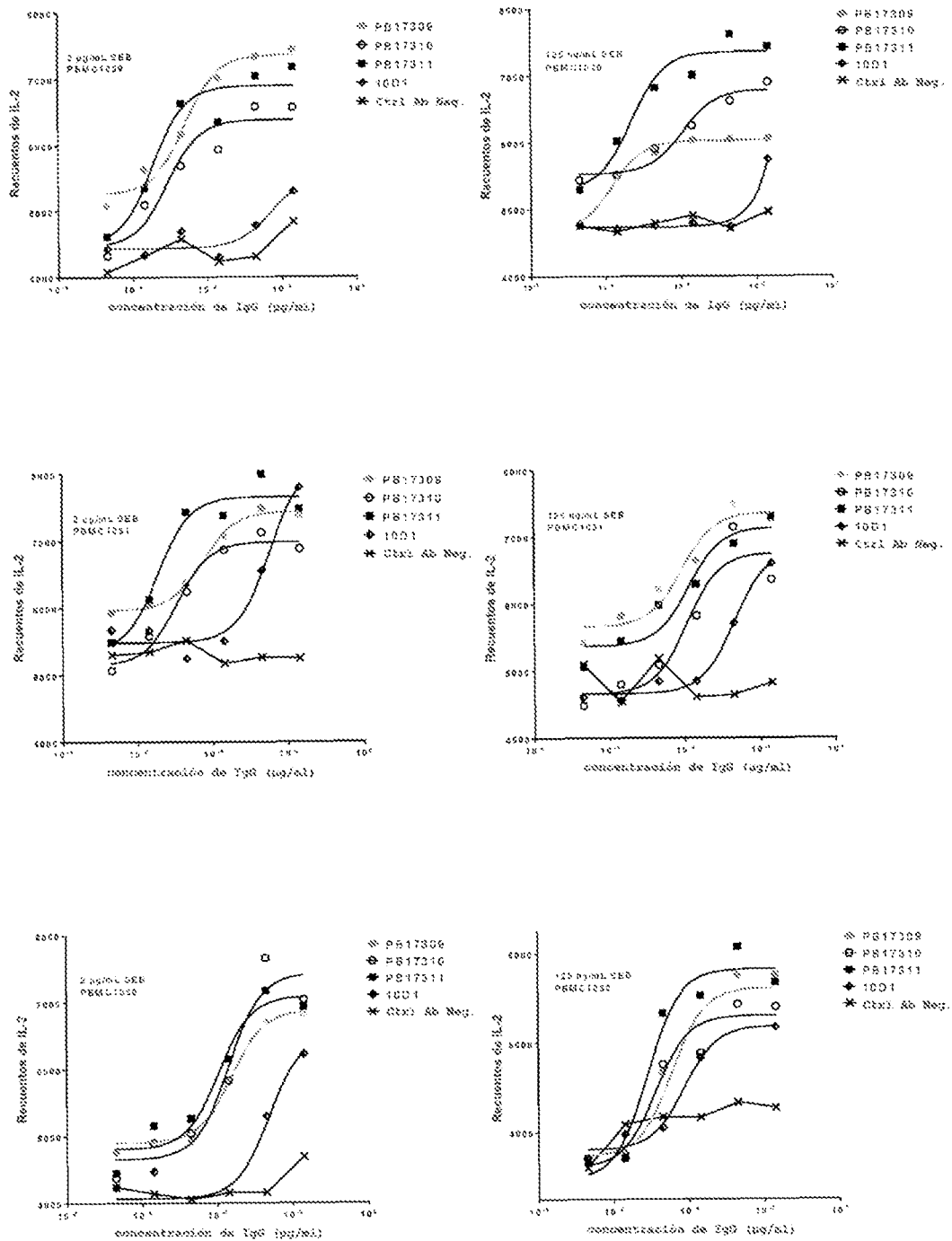


Figura 32

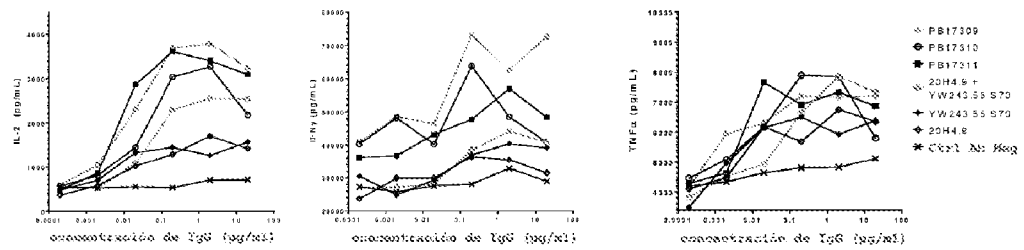


Figura 33

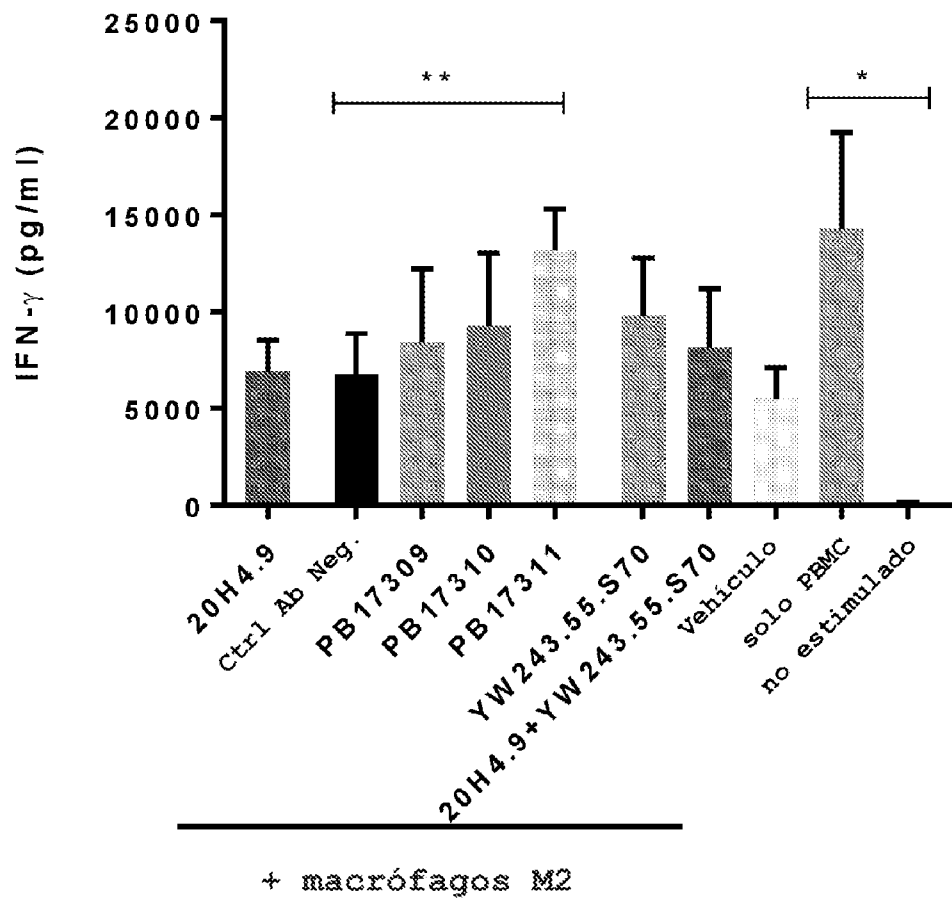


Figura 34

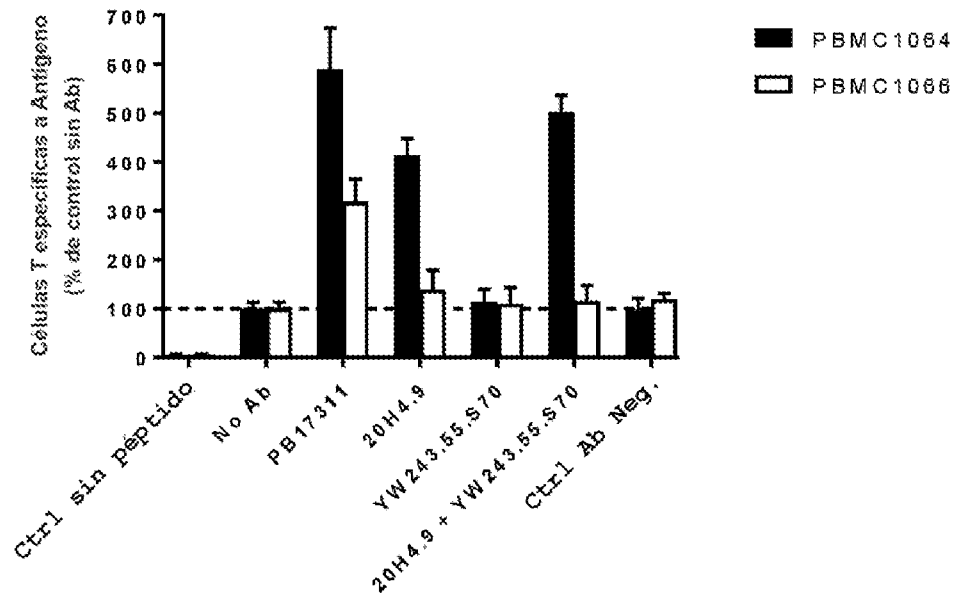


Figura 35

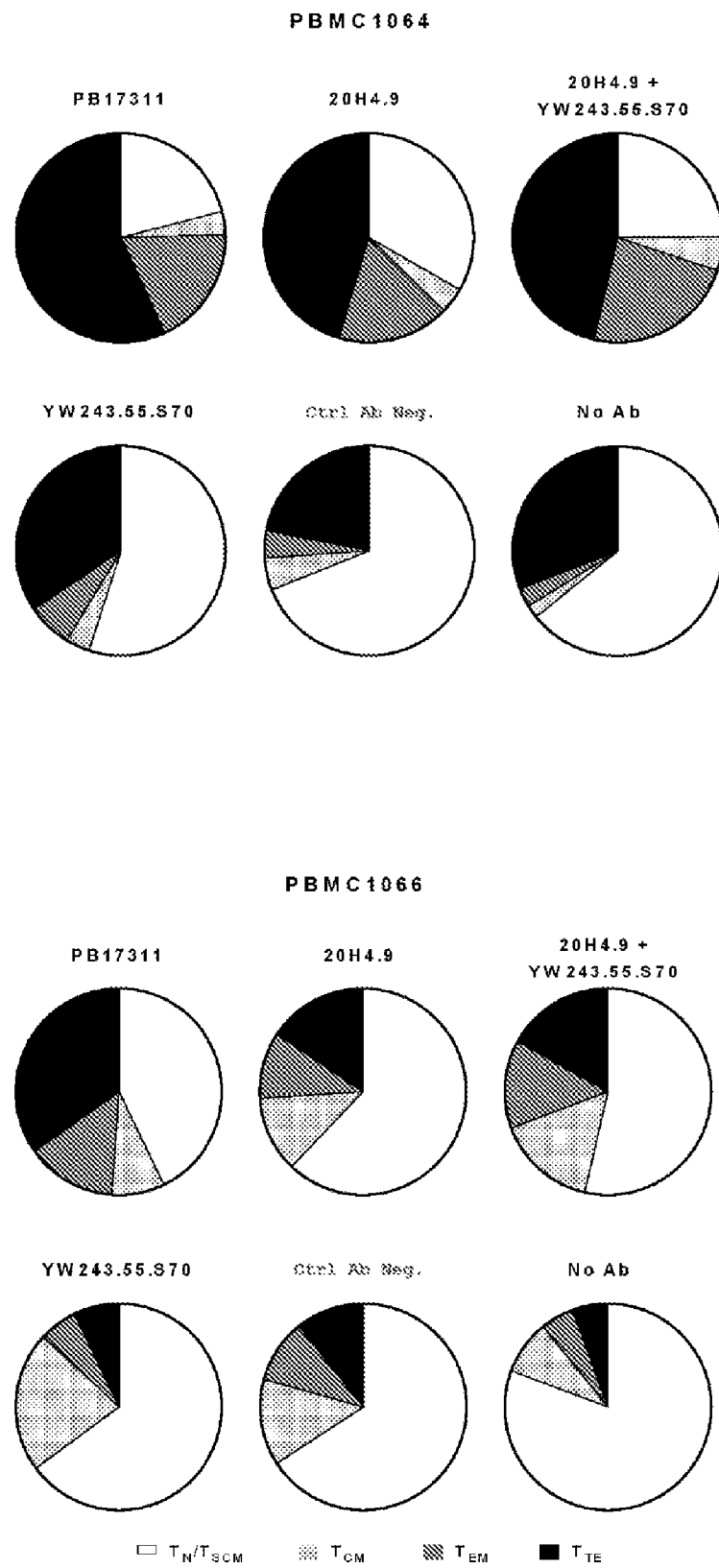


Figura 36

Población de células T total

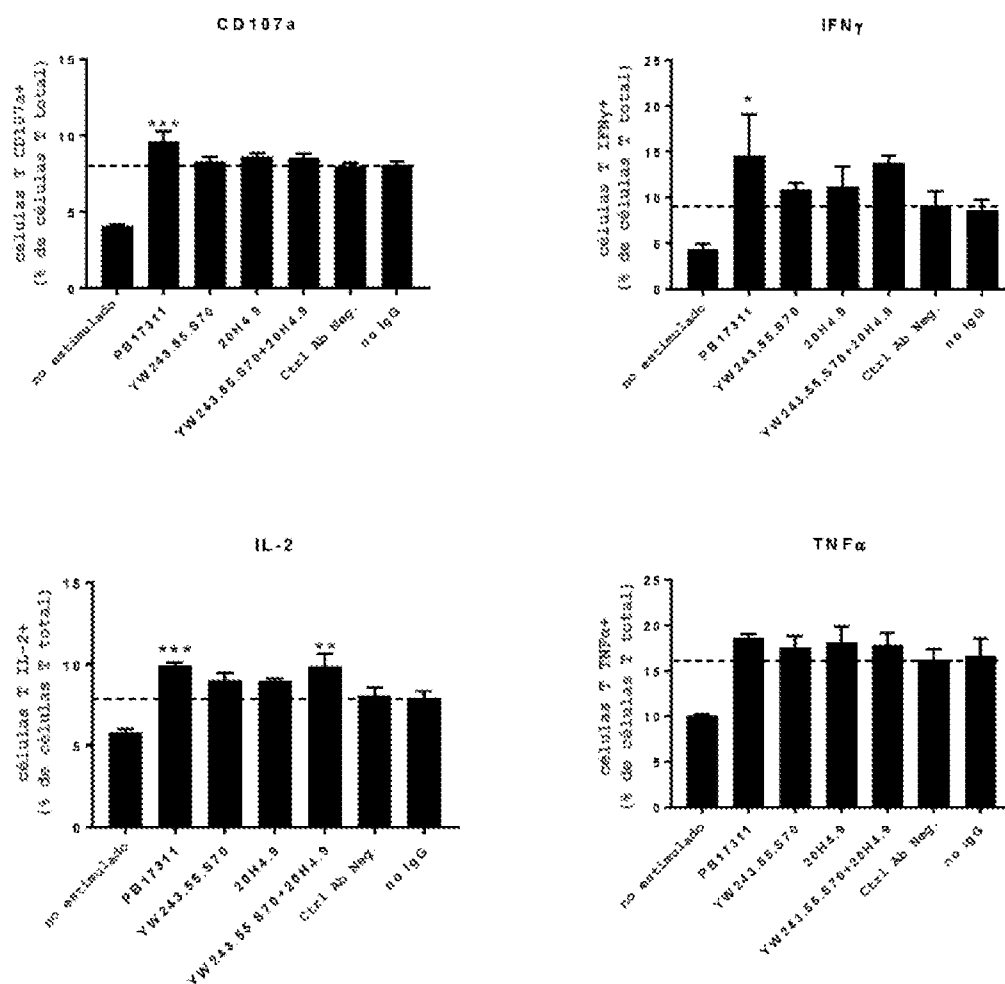
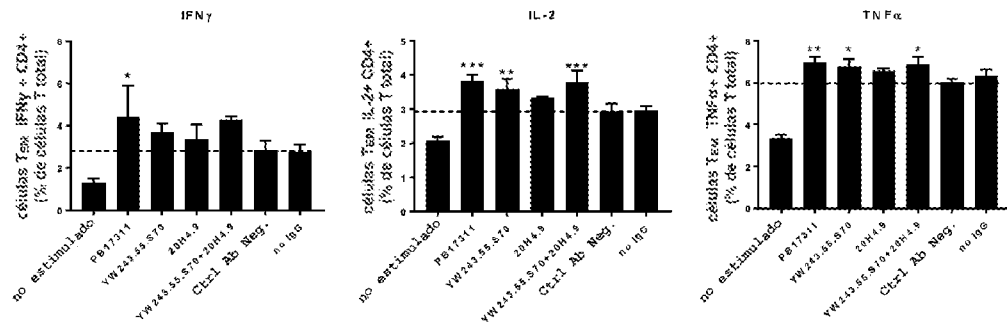
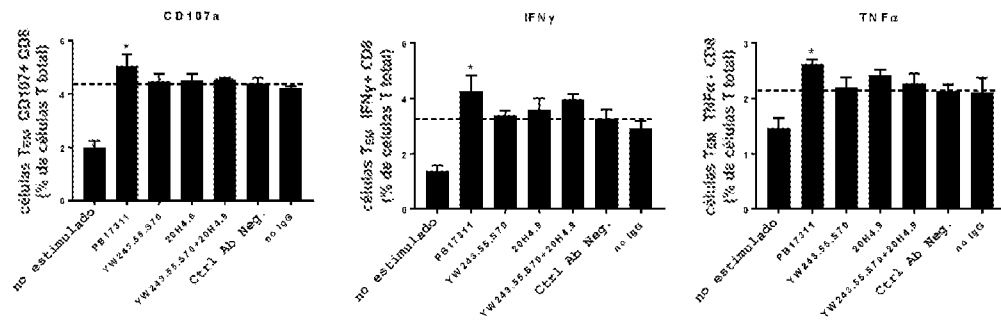


Figura 37

CD4 T_{EM}



CD8 T_{EM}



CD8 T_{TE}

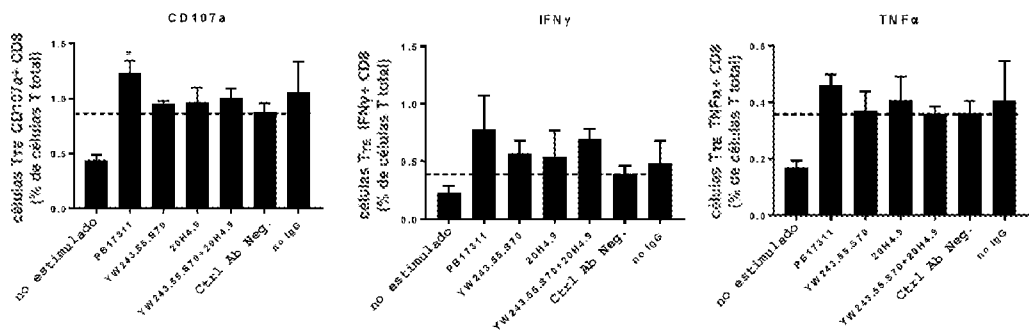


Figura 38

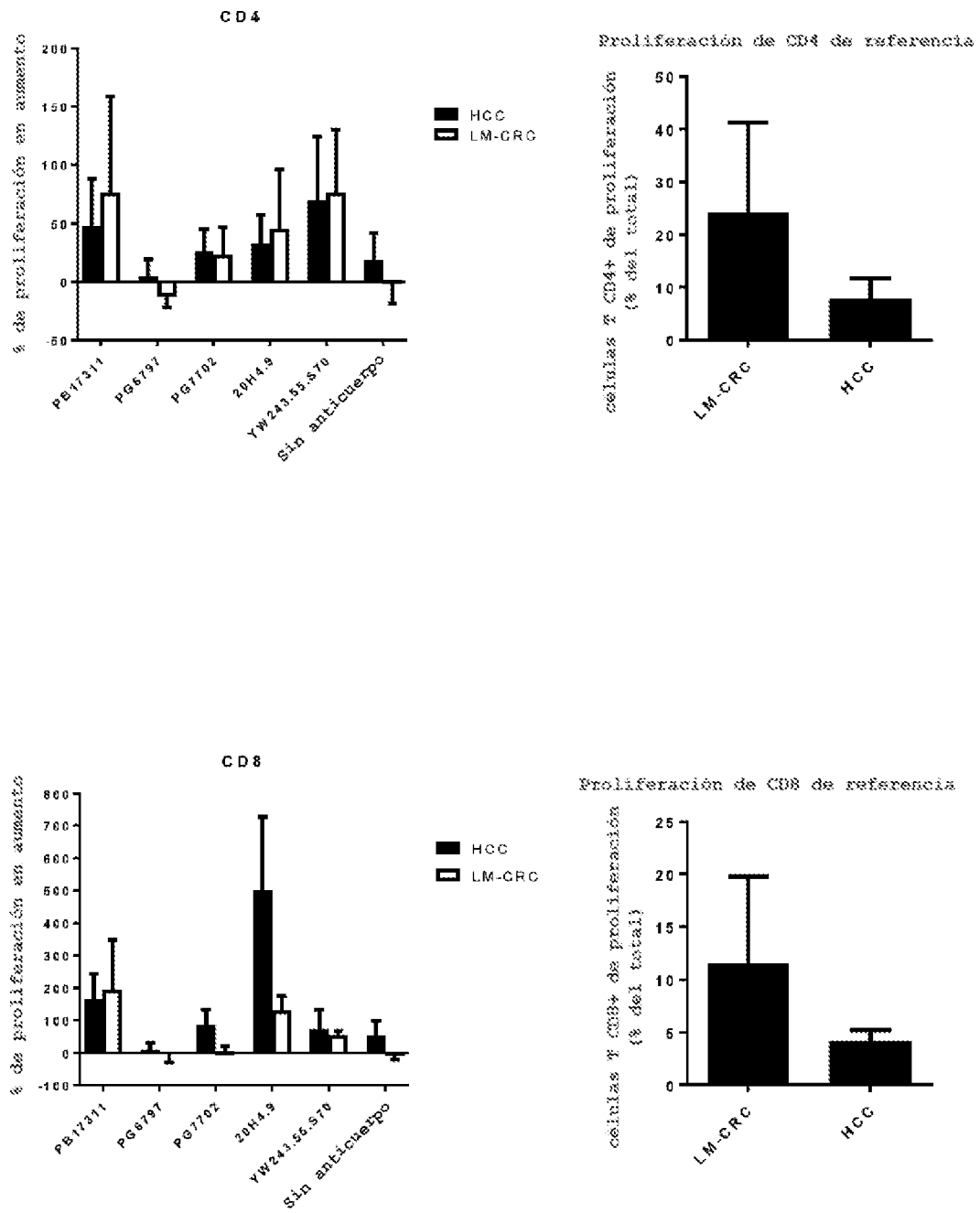


Figura 39

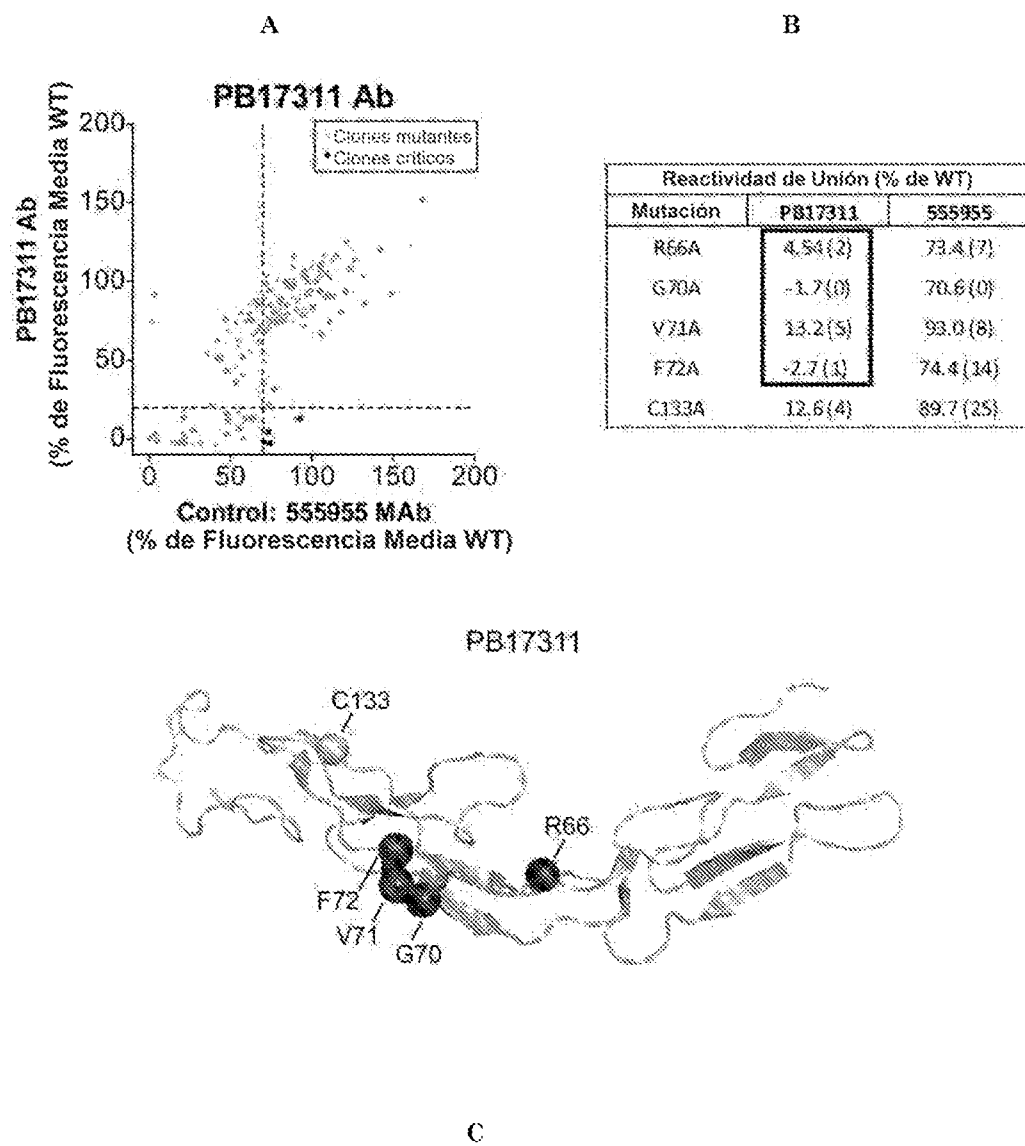


Figura 40

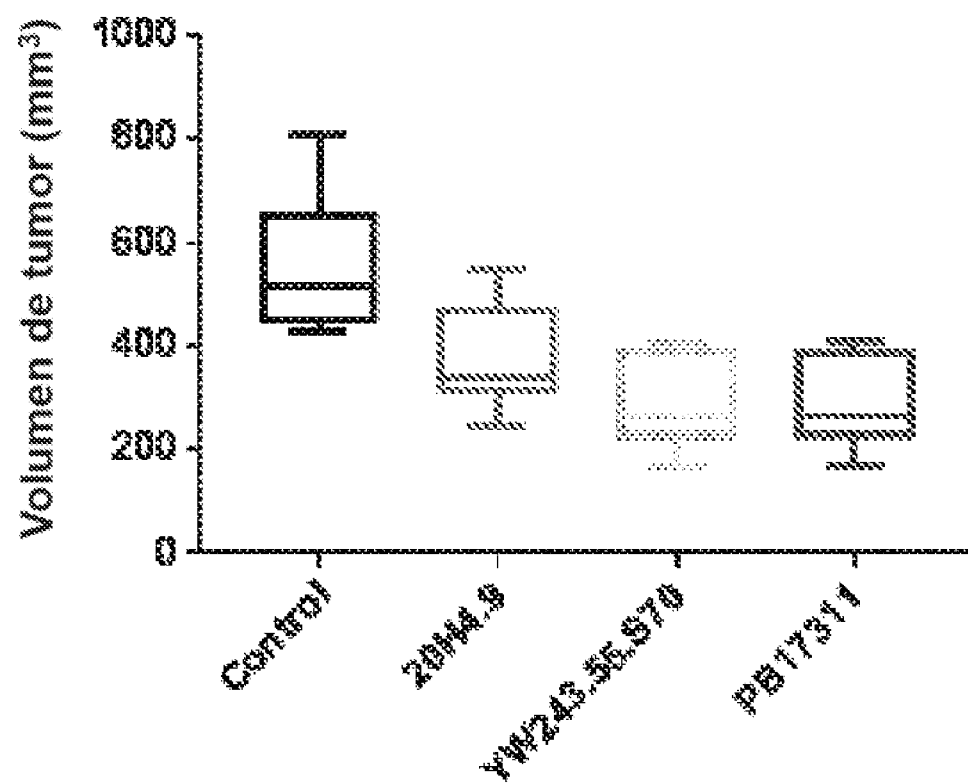


Figura 41

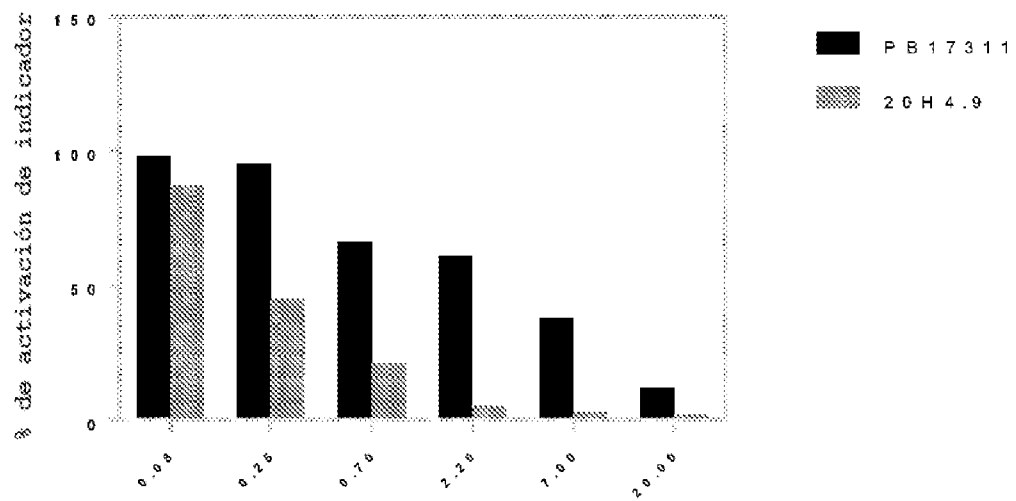


Figura 42

```

      1  MGNSCYNIVA  TLLLVLNFER  TRSLQDEPCSN  CPAGTFCDNN  RNQICSPCPP
     51  NSFSSAGGQR  TCDICRQCKG  MERTKKEQSS  TSNAECDCTP  GFHCLGAGCS
    101  MCEQDCKQGQ  ELTKKGCKDC  CFGTENDQNR  GICRPWTNQS  LDGKSVLVNG
    151  TKERDVVCGP  SPADLSPGAS  SVTPAPAPARE  PGHSPQIISF  FLALTSTALL
    201  FLLFFLTLEF  SVVKRGRKKL  LYIFKQPFMR  PVQTTQEEDG  CSCRFPEEEE
    251  CGCEL
  
```

Figura 43

MF6256

EVQLVQSGAEVKKPGSSMKVSKASGGTFSSYVISWVRQAPGQGLEWMGMIIPVEDT
SSYEKKFQGRITHADKSTSTVYLELSSLRSEDAAVYYCARGTVEATLLEDFWGQCTLV
 TVSS