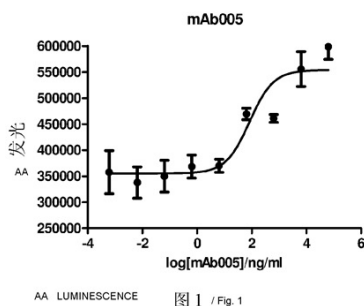


DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1	Título de la Invención (200 caracteres o espacios máximos)		
ANTICUERPO PD-1, FRAGMENTO DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE ESTE Y USO MÉDICO DE ESTE			
2	Datos del Solicitante		
Nombre:	SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.	Dirección Electrónica:	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
Dirección:	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.	Domicilio/País de constitución:	REPUBLICA POPULAR DE CHINA - SHANGHAI - SHANGHAI
Identificación:			

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

516861774985-

3

Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social

Tipo

Identificación

- | | | | |
|----|--|----|--------------|
| 1. | SHANGHAI HENGRUI
PHARMACEUTICAL CO., LTD. | NN | 516861774985 |
| 2. | JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO.,
LTD. | NN | 516861774986 |

4

Datos del Inventor

Nombre:

Jijun YUAN

**Dirección
Electrónica:**

notificacionespatentes@lloredacamacho.com

Dirección:

279 Wenjing
Road,
Minhang
District
Shanghai
200245, China.

**Domicilio/País
de
constitución:**

REPUBLICA POPULAR DE CHINA -
SHANGHAI - SHANGHAI

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA
☐ NIT
☐ PASAPORTE
☒ No Aplica

Número:

-

5

Inventor(es)

Apellidos - Nombres

Domicilio

- | | | |
|----|------------|----------------------------|
| 1. | YUAN Jijun | REPUBLICA POPULAR DE CHINA |
|----|------------|----------------------------|

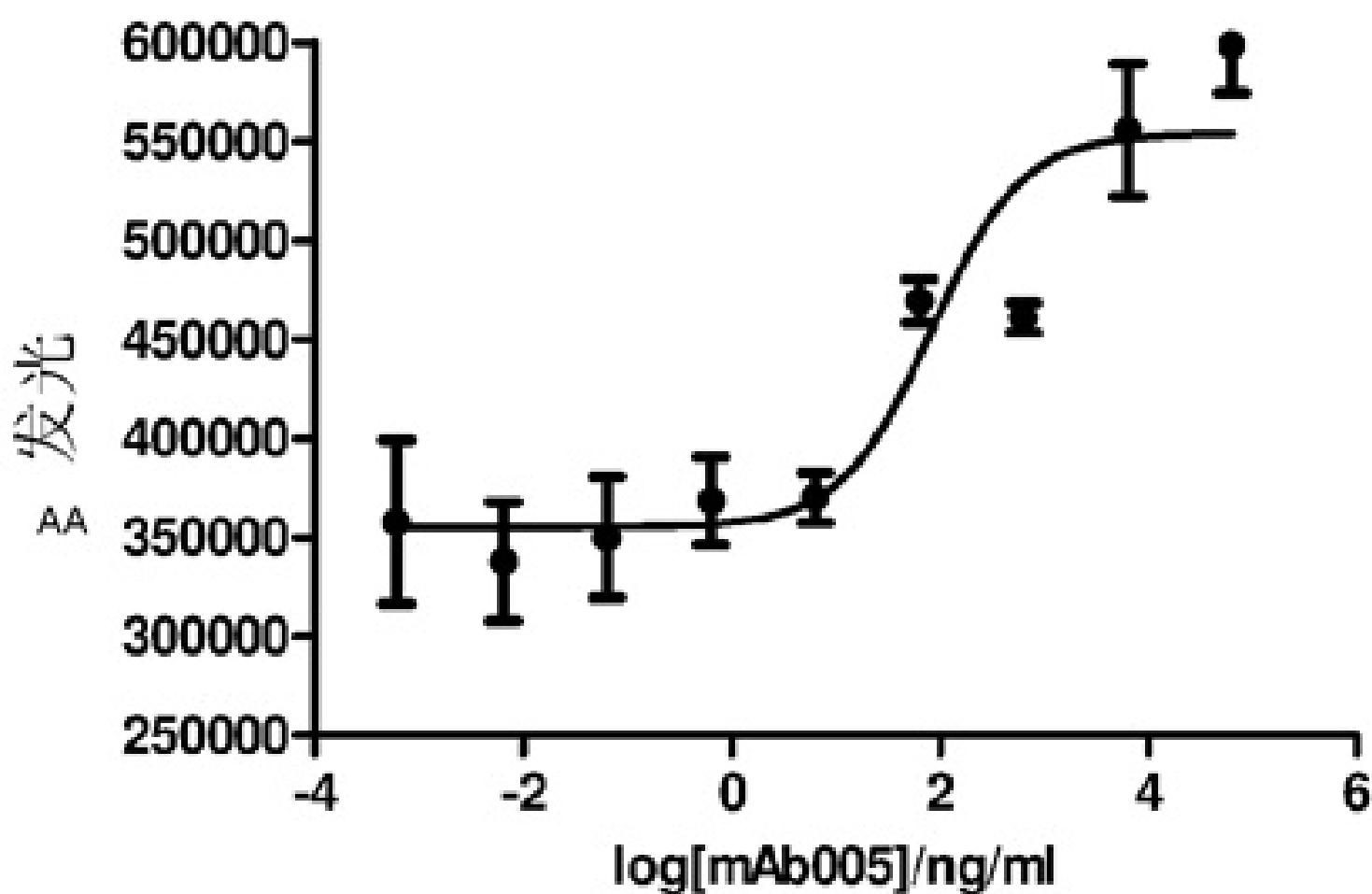
2.	QU Xiangdong	REPUBLICA POPULAR DE CHINA
3.	LIN Jufang	REPUBLICA POPULAR DE CHINA
4.	YE Xin	REPUBLICA POPULAR DE CHINA
5.	CAO Guoqing	REPUBLICA POPULAR DE CHINA
6.	TAO Weikang	REPUBLICA POPULAR DE CHINA
7.	ZHANG Lianshan	REPUBLICA POPULAR DE CHINA
8.	ZHANG Lei	REPUBLICA POPULAR DE CHINA
9.	YANG Li	REPUBLICA POPULAR DE CHINA

6	Datos Inventor(es)			
	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.
2.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.
3.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.
4.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.
5.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.

6.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.
7.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.
8.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.
9.	REPUBLICA POPULAR DE CHINA	SHANGHAI	SHANGHAI	279 Wenjing Road, Minhang District Shanghai 200245, China.
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		ALICIA LLOREDA RICAURTE	Dirección Electrónica:	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
Dirección:		Calle 72 No 5-83, piso 5	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - CUNDINAMARCA - BOGOTA D.C.
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE Número: 53215-				
Presentación de Poder				
Año de Radicación				
Número de Radicación				
8	Datos Solicitud: PCT / WO			
Número Solicitud:		PCT/CN2014/091090	Fecha Solicitud:	14/11/2014

Número Publicacion:		WO 2015/085847 A1	Fecha Publicacion:		18/06/2015
9	Declaraciones de prioridad		☒ SI ☐ NO		
1.	(33) País de origen REPUBLICA POPULAR DE CHINA	Codigo del país CN	(31) No. Solicitud 201310681942.6	(32) Fecha 12/12/2013	
10	Reivindicaciones				
Número reivindicaciones:		27	Pago Reivindicaciones:		No
11	Reducción de tasas.				
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.					
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos					
12	Documentos Anexos				
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen ☐ Certificado Depósito Material Biológico ☐ Uso de Conocimiento tradicional ☒ Listado de secuencias ☒ Artes finales 12 x 12 cm ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad ☒ Otros Anexos					

mAb005



AA LUMINESCENCE

图 1 / Fig. 1

ANTICUERPO PD-1, FRAGMENTO DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE ESTE Y USO MÉDICO DE ESTE

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un anticuerpo PD-1, a un fragmento de unión al antígeno de PD-1, a un anticuerpo quimérico y anticuerpos humanizados que comprenden la CDR del anticuerpo PD-1, así como una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo PD-1 y el fragmento de unión al antígeno de este, así como su uso como un fármaco anticanceroso.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inmunoterapia tumoral ha sido un punto clave en el área terapéutica tumoral durante mucho tiempo, y la inmunoterapia de cáncer asociado con los linfocitos T se encuentra en el punto central. La inmunoterapia tumoral afecta a los tumores al utilizar completamente y movilizar linfocitos T citotóxicos en pacientes con tumores; puede ser la forma más eficaz y segura de tratar el cáncer. Al mismo tiempo, el escape de los tumores es un obstáculo considerable al que se enfrenta la inmunoterapia tumoral, en la cual las células cancerígenas promueven un crecimiento rápido del tumor mediante su efecto de inhibición sobre el sistema inmunitario.

Hay una relación extremadamente compleja entre el mecanismo de escape inmunitario del tumor y la respuesta inmunitaria del cuerpo a los tumores. En una etapa temprana de la inmunoterapia tumoral, los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor tienen actividad biológica, pero pierden la función citotóxica en la etapa tardía del crecimiento tumoral. Es así que la inmunoterapia tumoral es para potenciar en gran medida la respuesta del sistema inmunitario del propio paciente al tumor. La clave de la inmunoterapia tumoral es no solo activar la respuesta del sistema inmunitario existente, sino también mantener la duración e intensidad de la respuesta del sistema inmunitario.

La activación de los linfocitos T humanos in vivo se lleva a cabo mediante un sistema de dos vías de señalización que no solo precisa administrar un péptido de antígeno MHC mediante células que contienen antígenos a linfocitos T para proporcionar una primera señal, sino que también requiere una serie de moléculas coestimulantes para proporcionar una segunda señal, y luego los linfocitos T presentan una respuesta

inmunitaria normal. Este sistema de doble señalización desempeña un papel vital en el balance del sistema inmunitario, y regula estrictamente las distintas respuestas inmunitarias estimuladas por antígenos endógenos y exógenos. La ausencia de una segunda señal proporcionada por moléculas coestimulantes no produce ninguna respuesta ni respuesta inmunitaria sostenida específica de los linfocitos T, lo que lleva a la tolerancia. Por lo tanto, la segunda vía de señalización desempeña un papel crucial en el proceso completo de la respuesta inmunitaria.

La muerte programada-1 (PD-1), que se halló en 1992, es un receptor de proteínas que se expresa en la superficie de los linfocitos T, y se ve implicado en la apoptosis celular. La PD-1 pertenece a la familia CD28, presenta 23 % de homología en la secuencia de aminoácidos con el antígeno asociado con linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4), pero se expresa principalmente en linfocitos T activados, linfocitos B y células mieloides, que son distintas de los CTLA. La PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2, respectivamente. El PD-L1 se expresa principalmente en linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células dendríticas (DC), y la expresión se regula por incremento en las células activadas. La expresión de PD-L2 se limita principalmente a células que presentan antígenos, tales como células dendríticas y macrófagos activados.

Nuevos estudios han detectado una expresión elevada de la proteína PD-L1 en tejidos tumorales humanos tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer intestinal, cáncer renal, melanoma y otros, y los niveles de expresión de PD-L1 se vinculan estrechamente a la afección clínica y a la prognosis de los pacientes. Debido a que PD-L1 inhibe la proliferación de linfocitos T mediante la segunda vía de señalización, el bloqueo de la unión de PD-L1/PD-1 se torna un objetivo muy prometedor en el campo de la inmunoterapia tumoral.

En la actualidad, hay varias empresas farmacéuticas multinacionales dedicadas a los anticuerpos monoclonales contra PD-1, que maximizan la respuesta inmunitaria propia de los pacientes contra el tumor al bloquear la unión de PD-L1/PD-1, y logran posteriormente el propósito de la muerte de las células tumorales, tal como en WO2009114335. En los resultados clínicos de los anticuerpos monoclonales PD-1 de BMS y Merck, se han observado determinadas tasas de respuesta en cáncer de pulmón no microcítico, melanoma y carcinoma renal, y la tasa de respuesta presentó prominentemente una relevancia elevada con la expresión de PD-L1 en tumores, lo que sugirió que el anticuerpo PD-1 provoca un efecto positivo sobre los tumores.

La presente invención proporciona un anticuerpo PD-1 con afinidad elevada, selectividad elevada y actividad biológica elevada.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende:

una región variable de cadena ligera que comprende al menos una LCDR que se selecciona de las secuencias que se muestran en: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; y

una región variable de cadena pesada que comprende al menos una HCDR que se selecciona de las secuencias que se muestran en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR1 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR2 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 7.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 8.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR1 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR2 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 4.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 5.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

En una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente; y donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este proporcionado en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo murino o un fragmento de este.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo murino o el fragmento de este proporcionado en la presente, la región variable de cadena ligera comprende además la FR de cadena ligera de la cadena λ , κ murina o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo murino o el fragmento de este proporcionado en la presente comprende además una región constante de cadena ligera de la cadena λ , κ murina o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo murino o el fragmento de este proporcionado en la presente, la región variable de cadena pesada comprende además la FR de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 murina o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo murino o el fragmento de este proporcionado en la presente comprende además una región constante de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 murina o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo PD-1 o fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un fragmento de este.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo quimérico PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente, la secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo quimérico es la SEQ ID NO: 10.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo quimérico PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente, la secuencia de región variable de cadena pesada del anticuerpo quimérico es la SEQ ID NO: 9.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo quimérico PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente comprende además una región constante de cadena ligera de la cadena λ , κ humana o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo quimérico PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente comprende además una región constante de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana o una variante de esta, preferentemente comprende una región constante de cadena pesada de IgG2 o IgG4 humana, o la de IgG1 que no tiene ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo) luego de la mutación de aminoácidos.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un fragmento de este.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo humanizado PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente, la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende además la FR de cadena ligera de la cadena λ , κ humana o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo humanizado PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente, la secuencia de FR de cadena ligera de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado se deriva de una secuencia de combinación de las cadenas ligeras de línea germinal humana IGKV1-39 y JK4, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 14, que comprende FR1, FR2 y FR3 de IGKV 1-39 y FR4 de JK4.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo humanizado PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente, la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo humanizado se muestra en la SEQ ID NO: 12 o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo humanizado PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente, la variante de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado comprende una mutación de 0-10 aminoácidos en la región variable de cadena ligera, preferentemente A43S.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo humanizado PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente comprende además una región constante de cadena ligera de la cadena λ , κ humana o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo humanizado PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente, la región variable de cadena pesada comprende además una FR de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humana o una variante de esta.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo humanizado PD-1 o fragmento de este proporcionado en la presente, la secuencia de FR de cadena pesada de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado se deriva de una secuencia de combinación de las cadenas pesadas de línea germinal humana IgHV3 y JH6, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 13, que comprende FR1, FR2 y FR3 de IgHV3-7 y FR4 de JH6.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo humanizado PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente, la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo humanizado se muestra en la SEQ ID NO: 11 o

una variante de esta; donde la variante comprende preferentemente una mutación de 0-10 aminoácidos en la región variable de cadena pesada, más preferentemente G44R.

En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo humanizado PD-1 o el fragmento de este proporcionado en la presente comprende además una región constante de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana o una variante de esta, y comprende preferentemente una región constante de cadena pesada de IgG2 o IgG4 humana que no tiene ADCC, o la de IgG1 que no tiene ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo) luego de la mutación de aminoácidos. La variante es preferentemente una mutación de región constante de cadena pesada que provoca deficiencia o atenuación de ADCC, y más preferentemente N297A, L234A, L235A de quimera de IgG2/4, IgG1, y F235E o L234A/E235A de IgG4.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con el anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno proporcionado en la presente, el fragmento de unión al antígeno es Fab, Fv, sFv o F(ab')₂.

La presente invención proporciona además una molécula de ADN que codifica el anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno descrito anteriormente.

La presente invención proporciona además un vector de expresión que comprende la molécula de ADN tal como se describió anteriormente.

La presente invención proporciona además una célula hospedadora transformada con el vector de expresión tal como se describió anteriormente.

En una modalidad preferida de la presente invención, de acuerdo con la célula hospedadora proporcionada en la presente, la célula hospedadora es una bacteria, preferentemente *E. coli*.

En una modalidad preferida de la presente invención, la célula hospedadora proporcionada en la presente es una levadura, preferentemente *Pichia pastoris*.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este tal como

se describe en la presente y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además el uso del anticuerpo PD-1 antemencionado o el fragmento de unión al antígeno, o la composición farmacéutica que lo contiene, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por PD-1; donde la enfermedad es preferentemente cáncer, más preferentemente cáncer que expresa PD-L1; y el cáncer es preferentemente cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer intestinal, cáncer renal, melanoma y, más preferentemente, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma y cáncer renal.

La presente invención proporciona además un método para el tratamiento y la prevención de la enfermedad o trastorno mediado por PD-1, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo PD-1 o del fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la invención, o la composición farmacéutica que lo comprende; donde la enfermedad es preferentemente cáncer, más preferentemente cáncer que expresa PD-L1; el cáncer es preferentemente cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer intestinal, cáncer renal, melanoma, cáncer de pulmón no microcítico y, más preferentemente, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma y cáncer renal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica humana. Los resultados muestran que el anticuerpo PD-1 mAb005 evaluado puede estimular de forma eficaz la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica humana, con una EC50 de 83 ng/ml.

Figura 2: evaluación de secreción de la citocina IFN- γ de células mononucleares de sangre periférica humana. Los resultados muestran que el anticuerpo PD-1 mAb005 evaluado puede estimular la proliferación de PBMC, y estimular al mismo tiempo de forma eficaz la secreción de la citocina IFN- γ , con una EC50 de 13 ng/ml.

Figura 3: efecto de inhibición del anticuerpo PD-1 H005-1 sobre el crecimiento de células de glioma.

Figura 4: diagrama que muestra el cambio del volumen tumoral después del tratamiento.

Figura 5: diagrama que muestra el cambio del peso de los ratones después del tratamiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Definiciones

Con la finalidad de comprender más fácilmente la invención, se definen de forma específica determinados términos técnicos y científicos a continuación. A menos que se defina de forma específica en otra parte de este documento, el resto de los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que le otorgue comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

Tal como se usa en la presente, el código de una letra y el código de tres letras de los aminoácidos son los que se describen en J. biol. chem, 243, (1968) p3558.

Tal como se usa en la presente, "anticuerpo" se refiere a la inmunoglobulina, una estructura de cadena de cuatro péptidos conectados entre sí mediante enlaces disulfuro entre dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Distintas regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina presentan distintas composiciones de aminoácidos y órdenes de clasificación, por lo que presentan distintos tipos de antigenicidad. Por consiguiente, las inmunoglobulinas pueden dividirse en cinco categorías, o denominarse isotipos de inmunoglobulina, a saber, IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, sus cadenas pesadas son la cadena μ , cadena δ , cadena γ , cadena α y cadena ϵ , respectivamente. De acuerdo con su composición de aminoácidos de la región bisagra y la cantidad y ubicación de los enlaces disulfuro de la cadena pesada, el mismo tipo de Ig puede dividirse en distintas subcategorías, por ejemplo, la IgG puede dividirse en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La cadena ligera puede dividirse en la cadena κ o λ , teniendo en cuenta las distintas regiones constantes. Cada una de las cinco Ig puede tener una cadena κ o λ .

En la presente invención, la región variable de cadena ligera del anticuerpo mencionado en la presente comprende además una región constante de cadena ligera, que comprende una cadena λ , κ murina o una variante de esta.

En la presente invención, la región variable de cadena pesada del anticuerpo mencionado en la presente comprende además una región constante de cadena pesada, que comprende IgG1, 2, 3, 4 humana o murina, o una variante de esta.

Cerca de la secuencia del extremo N de las cadenas pesadas y cadenas ligeras del anticuerpo, la secuencia de alrededor de 110 aminoácidos, conocida como la región variable (región V) varía en gran medida; el resto de la secuencia de aminoácidos cerca del extremo C es relativamente estable, y se conoce como la región constante (región C). La región variable comprende tres regiones hipervariables (HVR) y cuatro regiones marco (FR) de secuencia relativamente conservada. Las tres regiones hipervariables determinan la especificidad del anticuerpo, y también se conocen como regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Cada región variable de cadena ligera (LCVR) y cada región variable de cadena pesada (HCVR) está compuesta por tres CDR y cuatro FR, donde el orden secuencial desde el extremo amino al extremo carboxilo es: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las tres CDR de la cadena ligera se refieren a LCDR1, LCDR2 y LCDR3; las tres CDR de cadena pesada se refieren a HCDR1, HCDR2 y HCDR3. La cantidad y ubicación de los residuos de aminoácido de las CDR en LCVR y HCVR del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno de la presente se corresponden con criterios conocidos de numeración de Kabat (LCDR1-3, HCDE2-3) o se corresponden con criterios de numeración de Kabat y Chothia (HCDR1).

La expresión “anticuerpo murino” en la presente invención se refiere al anticuerpo monoclonal antihumano PD-1 preparado de acuerdo con el conocimiento y habilidades de la técnica. Durante la preparación, se inyectó a un sujeto de prueba con el antígeno PD-1, y luego se separó el hibridoma que expresaba el anticuerpo que posee las características funcionales o secuencia deseada. En una modalidad preferida de la presente invención, el anticuerpo PD-1 murino o el fragmento de unión al antígeno de este comprende además una región constante de cadena ligera de cadena λ , κ murina o una variante de esta, o comprende además una región constante de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 murina, o una variante de esta.

La expresión “anticuerpo quimérico” es un anticuerpo que se forma al fusionar la región variable de un anticuerpo murino con la región constante de un anticuerpo humano, donde el anticuerpo quimérico puede aliviar la respuesta inmunitaria inducida por el anticuerpo murino. Para establecer un anticuerpo quimérico, se establece primero un hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal murino específico, se clona un gen de región variable a partir de células de hibridoma de ratón, luego se clona un gen de región constante de un anticuerpo humano según se desee, el gen de región variable de ratón se liga con el gen de región constante humano para formar un gen quimérico que pueda insertarse en un vector humano y, finalmente, la molécula de anticuerpo quimérico se expresa en el sistema industrial eucariota o procariota. En una modalidad preferida de la presente invención, la región variable de cadena ligera del anticuerpo quimérico PD-1 comprende además la FR de cadena ligera de la cadena λ , κ murina o una variante de esta, y la secuencia de la región variable de cadena ligera se muestra en la SEQ ID NO: 10. La región variable de cadena pesada del anticuerpo quimérico PD-1 comprende además la FR de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 murina o una variante de esta, y la secuencia de la región variable de cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 10. La región constante de un anticuerpo humano se selecciona de la región constante de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana o una variante de esta, preferentemente comprende la región constante de cadena pesada de IgG2 o IgG4 humana, o la de IgG1 que no tiene ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo) luego de la mutación de aminoácidos.

La expresión “anticuerpo humanizado”, también conocido como anticuerpo con injerto de CDR, se refiere a un anticuerpo generado mediante el injerto de secuencias CDR murinas en un marco de región variable de un anticuerpo humano, a saber, una secuencia de marco de anticuerpo de línea germinal humana de un tipo distinto. El anticuerpo humanizado supera la respuesta potente del anticuerpo inducida por el anticuerpo quimérico que porta una gran cantidad de componentes de proteína murina. Dichas secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas que abarcan secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal o referencias publicadas. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal de genes de región variable de cadena ligera y pesada humana pueden hallarse en la base de datos de secuencias de líneas germinales humanas “VBase” (disponible en la web www.mrccpe.com.ac.uk/vbase), así como en Kabat, EA, et ál., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^{ta} Ed. En una modalidad preferida de la invención, las secuencias de CDR murina del anticuerpo humanizado PD-1 se

seleccionan de las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8. Los marcos de región variable de anticuerpo humano se designaron y seleccionaron de forma tal que la secuencia de FR de cadena ligera de la región variable de cadena ligera del anticuerpo se derive de la secuencia de combinación de las cadenas ligeras de línea germinal humana IGKV1-39 y JK4. SEQ ID NO: 14, que comprende FR1, FR2 y FR3 de IGKV 1-39 y FR4 de JK4; la secuencia de FR de cadena pesada de la región variable de cadena pesada del anticuerpo se deriva de la secuencia de combinación de las cadenas pesadas de línea germinal humana IgHV3-7 y JH6: SEQ ID NO: 13, que comprende FR1, FR2 y FR3 de IgHV3-7 y FR4 de JH6. Para evitar la disminución de la actividad durante la reducción de inmunogenicidad, la región variable del anticuerpo humano se somete a una retromutación mínima para mantener la actividad.

Tal como se usa en la presente, “fragmento de unión al antígeno” se refiere a un fragmento Fab, un fragmento Fab’, un fragmento F(ab’)2 con actividad de unión a antígenos, así como un fragmento Fv, fragmento sFv que se une a la PD-1 humana; que comprende una o más regiones CDR de los anticuerpos descritos en la presente invención seleccionados del grupo que consiste en la SEQ ID NO:3 a la SEQ ID NO:8. El fragmento Fv es un fragmento de anticuerpo mínimo que comprende una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera y todos los sitios de unión al antígeno sin una región constante. Generalmente, un anticuerpo Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL, y es capaz de formar una estructura necesaria para la unión al antígeno. A su vez, pueden utilizarse distintos enlazadores para conectar las regiones variables de dos anticuerpos para formar un polipéptido, denominado anticuerpo de cadena sencilla o Fv de cadena sencilla (sFv). Tal como se usa en la presente, la expresión “unión con PD-1” significa interacción con PD-1 humana. Tal como se usa en la presente, la expresión “determinante antigénico” de la presente invención se refiere a sitios tridimensionales discontinuos del antígeno, a saber, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la presente invención.

Tal como se usa en la presente, el término “ADCC”, a saber, citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo, se refiere a las células que expresan receptores Fc y directamente matan células objetivo recubiertas por un anticuerpo mediante el reconocimiento del segmento de Fc del anticuerpo. La función efectora de ADCC del anticuerpo puede reducirse o eliminarse mediante la modificación del segmento de Fc en la IgG. La modificación se refiere a mutaciones de la región constante de cadena pesada del anticuerpo, tales como mutaciones seleccionadas

de N297A, L234A, L235A en IgG1; quimera de IgG2/4; F235E, o mutaciones L234A/E235A en IgG4.

Tal como se usa en la presente, la proteína de fusión descrita en la presente invención es un producto de proteína obtenido mediante la coexpresión de dos genes mediante tecnología de ADN recombinante. La proteína de fusión de Fc del dominio extracelular de PD-1 recombinante se obtiene mediante la coexpresión de un dominio extracelular de PD-1 y un fragmento Fc de anticuerpo humano mediante tecnología de ADN recombinante. El dominio extracelular de PD-1 se refiere al resto de PD-1 por fuera de la citomembrana, donde la secuencia es la región copiada de la SEQ ID NO: 1 que figura más adelante.

Los métodos para la producción y purificación de anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno son conocidos en la técnica y pueden hallarse, por ejemplo, en *Antibody Experimental Technology Guide of Cold Spring Harbor*, Capítulos 5-8 y 15. Por ejemplo, los ratones pueden inmunizarse con PD-1 humana, o fragmentos de esta, y los anticuerpos resultantes pueden renaturalizarse, purificarse y secuenciarse mediante el uso de métodos convencionales conocidos en la técnica. Los fragmentos de unión al antígeno también pueden prepararse mediante métodos convencionales. El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de la presente invención se modificó genéticamente para introducir una o más regiones marco humanas (FRs) en una CDR derivada no humana. Las secuencias de línea germinal de FR humana pueden obtenerse de ImMunoGeneTics(IMGt) a través de su sitio web <http://imgt.cines.fr>, o de *The Immunoglobulin FactsBook*, 2001 ISBN 012441351. Específicamente, las líneas germinales de FR de cadena ligera para su uso en el anticuerpo o en el fragmento de unión al antígeno de la presente invención incluyen A3 y O2. Las líneas germinales particulares de FR de cadena pesada para su uso en el anticuerpo o en el fragmento de unión al antígeno de la presente invención incluyen VH3-21 y VH3-23.

El anticuerpo modificado o fragmento de unión al antígeno de la presente invención puede prepararse y purificarse mediante el uso de métodos convencionales. Por ejemplo, las secuencias de ADNc que codifican una cadena pesada (SEQ ID NO: 11) y una cadena ligera (SEQ ID NO: 12) pueden clonarse y recombinarse en un vector de expresión GS. El vector de expresión de inmunoglobulina recombinado puede entonces transfectar células CHO de forma estable. Como un método más recomendado conocido en la técnica, la expresión de mamíferos de los anticuerpos produce glicosilación, típicamente en el extremo N altamente conservado de la región

FC. Pueden obtenerse clones estables mediante la expresión de un anticuerpo que se une específicamente a PCSK9 humana. Los clones positivos pueden expandirse en un medio de cultivo sin suero para la producción de anticuerpos en biorreactores. El medio de cultivo en el que se ha secretado un anticuerpo puede purificarse mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, el medio puede aplicarse de forma conveniente a una columna FF de Sefarosa de Proteína A o G que se equilibró con un amortiguador compatible. La columna se lava para extraer componentes de unión no específica. El anticuerpo unido se eluye mediante gradiente de PH y los fragmentos de anticuerpo se detectan mediante SDS-PAGE, y luego se extraen. El anticuerpo puede filtrarse y concentrarse mediante el uso de técnicas comunes. Los multímeros y agregados solubles pueden extraerse eficazmente mediante técnicas comunes, inclusive exclusión por tamaño o intercambio iónico. El producto obtenido puede congelarse inmediatamente, por ejemplo, a -70 °C, o puede liofilizarse.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal o mAb, tal como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que se deriva de un único clon, inclusive, de modo no taxativo, un clon de fago, eucariota o procariota. Los anticuerpos monoclonales y los fragmentos de unión al antígeno de estos pueden recombinarse, por ejemplo, mediante tecnologías de hibridoma, tecnologías recombinantes, tecnologías de expresión de fagos, tecnologías sintéticas (por ejemplo, injerto de CDR) u otras tecnologías conocidas en la técnica.

“Administración” y “tratamiento”, tal como se aplican a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere a poner en contacto una composición o agente de diagnóstico, terapéutico, farmacéutico exógeno con el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. “Administración” y “tratamiento” pueden hacer referencia, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación y experimentales. El tratamiento de una célula comprende poner en contacto un reactivo con la célula, así como poner en contacto un reactivo con un fluido, donde el fluido se encuentra en contacto con la célula. “Administración” y “tratamiento” también significan tratamientos in vitro y ex vivo, por ejemplo, de una célula, mediante un compuesto reactivo, de diagnóstico, de unión o mediante otra célula. “Tratamiento”, según se aplica a un sujeto de investigación, veterinaria o ser humano, se refiere a tratamiento terapéutico, medidas profilácticas o preventivas, y aplicaciones de diagnóstico e investigación.

“Tratar” significa administrar un agente terapéutico, tal como una composición que comprende cualquiera de los compuestos de unión de la presente invención, de forma interna o externa, a un paciente que padece uno o más síntomas de la enfermedad para los cuales el agente tiene una actividad terapéutica conocida. Típicamente, el agente se administra en una cantidad eficaz para aliviar uno o más síntomas de la enfermedad en el paciente o población tratados, ya sea mediante la inducción de la regresión o la inhibición de la evolución de dichos síntomas a cualquier grado clínicamente mensurable. La cantidad de agente terapéutico eficaz para aliviar cualquier síntoma de enfermedad en particular (también denominada “cantidad terapéuticamente eficaz”) puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad y peso del paciente, y la capacidad del fármaco de provocar una respuesta deseada en el paciente. El grado de alivio de un síntoma de una enfermedad puede evaluarse mediante cualquier medición clínica utilizada típicamente por los médicos u otros proveedores de cuidados de la salud, para evaluar la gravedad o estado de evolución de dicho síntoma. Si bien una modalidad de la presente invención (por ejemplo, un método de tratamiento o artículo de fabricación) puede no ser eficaz en el alivio del síntoma de la enfermedad de interés en todos los pacientes, debería aliviar el o los síntomas objetivo de la enfermedad de interés en una cantidad estadísticamente significativa de pacientes, según se determine mediante cualquier prueba estadística conocida en la técnica, tal como la prueba t de Student, la prueba Chi Cuadrado, la prueba U de acuerdo con Mann y Whitney, la prueba Kruskal-Wallis (prueba H), la prueba Jonckheere-Terpstra y la prueba Wilcoxon.

“Modificaciones conservadoras” o “sustitución o remplazo conservador” se refiere a sustituciones de aminoácidos en una proteína con otros aminoácidos que tengan características similares (por ejemplo, carga, tamaño de la cadena lateral, hidrofobicidad/hidrofilicidad, rigidez y conformación de la estructura principal, etc.), de forma que puedan realizarse cambios de forma frecuente sin alterar la actividad biológica de la proteína. Los expertos en la técnica reconocerán que, en general, las sustituciones de un aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran la actividad biológica de forma sustancial (ver, por ejemplo, Watson et ál. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4^{ta} Ed.)). Además, es menos probable que las sustituciones de aminoácidos similares de forma estructural o funcional alteren la actividad biológica.

“Consistir esencialmente en”, o sus variaciones tal como se utilizan en la memoria descriptiva y reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos enumerados, y la inclusión opcional de otros elementos de naturaleza similar o distinta a la de los elementos enumerados, que no cambian fundamentalmente las propiedades básicas o novedosas de la composición, método o régimen de dosificación especificado. Como ejemplo no taxativo, un compuesto de unión que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos mencionada también puede incluir uno o más aminoácidos que no afectan de forma fundamental las propiedades del compuesto de unión.

“Cantidad eficaz” abarca una cantidad suficiente para mejorar o prevenir un síntoma o signo de una afección médica. Cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar un diagnóstico. Una cantidad eficaz para un sujeto veterinario o paciente en particular puede variar según factores tales como la afección que se trata, la salud general del paciente, la vía y dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o protocolo de dosificación que evite efectos tóxicos o efectos secundarios significativos.

“Exógeno” se refiere a sustancias que se producen en el exterior de un organismo, célula o cuerpo humano, dependiendo del contexto. “Endógeno” se refiere a sustancias que se producen en el interior de un organismo, célula o cuerpo humano, dependiendo del contexto.

“Homología” se refiere a una similitud de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos o entre dos polipéptidos. Cuando una posición en ambas de las secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad de monómero de aminoácido o base, por ejemplo, si una posición en cada una de dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en dicha posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por la cantidad de posiciones comparadas $\times 100$. Por ejemplo, si 6 de 10 posiciones de dos secuencias coinciden o son homólogas cuando las secuencias se alinean de forma óptima, entonces las dos secuencias son 60 % homólogas. Generalmente, la comparación se realiza cuando dos secuencias se alinean para proporcionar un porcentaje máximo de homología.

Tal como se usa en la presente, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan de manera intercambiable y todas dichas designaciones incluyen la progenie. Por lo tanto, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula primaria de la presente y los cultivos derivados de esta sin importar la cantidad de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en cuanto al contenido de ADN, debido a mutaciones inadvertidas o deliberadas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la evaluada en la célula originalmente transformada. En los casos donde se pretenden realizar las designaciones de forma separada, esto se comprenderá a partir del contexto.

Tal como se usa en la presente “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR” se refiere a un procedimiento o técnica en la cual se amplifican cantidades mínimas de un resto específico de ácido nucleico, ARN y/o ADN, tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4,683,195. Generalmente, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá de esta precisa estar disponible, de forma tal que puedan diseñarse cebadores de oligonucleótidos; las secuencias de estos cebadores serán idénticas o similares a las cadenas correspondientes de la plantilla que debe amplificarse. Los nucleótidos del extremo 5' de los dos cebadores pueden ser idénticos a los extremos del material a amplificar. La PCR puede utilizarse para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas del ADN genómico total, y ADNc transcrito a partir de ARN celular total, secuencias de plásmidos o bacteriófagos, etc. Ver generalmente Mullis et ál., (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). Tal como se usa en la presente, la PCR se considera como un ejemplo, pero no el único, de un método de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico, que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar un resto específico del ácido nucleico.

“Opcional” u “opcionalmente” significa que el evento o situación que figura a continuación puede suceder, pero no necesariamente, y la descripción incluye las instancias en las cuales el evento o circunstancia sucede o no sucede. Por ejemplo “comprende opcionalmente 1-3 regiones variables de cadena pesada del anticuerpo” significa que la región variable de cadena pesada del anticuerpo con una secuencia específica puede estar presente, pero no necesariamente.

“Composición farmacéutica” se refiere a una que contiene una mezcla de uno o más compuestos de acuerdo con la presente invención o una sal fisiológicamente/farmacéuticamente aceptable o profármaco de esta con otros componentes químicos, así como componentes adicionales, tales como portadores y excipientes fisiológicamente/farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica pretende promover la administración de un organismo, facilitar la absorción del ingrediente activo y, de esta forma, producir un efecto biológico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En lo sucesivo, la presente invención se describe en detalle con referencia a ejemplos; no obstante, el alcance de la presente invención no se limita a estos. En los ejemplos de la presente invención, cuando no se describen condiciones específicas, los experimentos se llevan a cabo generalmente en condiciones convencionales tales como se describe en Antibody Technology Laboratory Manual and Molecular Cloning Manual of Cold Spring Harbor, o en condiciones propuestas por los fabricantes del producto o material. Cuando la fuente de los reactivos no se proporciona de forma específica, los reactivos son reactivos convencionales disponibles en el mercado.

Ejemplo 1 Preparación de anticuerpos

Se generaron anticuerpos monoclonales murinos contra PD-1 humana. Se utilizó la proteína de fusión del dominio extracelular Fc de PD-1 (PD-1 Fc) purificada recombinante (SEQ ID NO: 1); o células CHO transfectadas con PD-1 (SEQ ID NO: 2) como un antígeno para inmunizar a ratones Balb/C y SJL. El antígeno PD-1 humano se compró de ORIGENE, n.º de catálogo SC117011, secuencia de referencia de NCBI: NM_005018.1.

PD-1 Fc, proteína de fusión del dominio extracelular Fc de PD-1 recombinante (SEQ ID NO: 1):

MDMRVPAQLLGLLLWFPGSRCPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATF
TCSFSNTSEFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDF
HMSVVRARRNDSGTYLCAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPR
PAGQFQTLVDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK .

PD-1, células de transfección del antígeno de PD-1 (SEQ ID NO: 2):

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVVTEDGNATFT
CSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFH
MSVVRARRNDSGTLYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRP
AGQFQTLVVGTVGGLLGSLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAV
PVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGP
RSAQPLRPEDGHCSWPL .

La inmunización con la proteína de fusión del dominio extracelular Fc de PD-1 se divide en dosis elevada (50 ug) y dosis baja (10 ug) del antígeno purificado, la inmunización con las células CHO transfectadas con PD-1 utiliza $0,5-1 \times 10^7$ células. La inmunización se llevó a cabo los días 0, 14 y 35, respectivamente, con adyuvante de Freund completo; se muestreó sangre en el sitio retroorbital para monitorear la respuesta inmunitaria. Se obtuvieron los ratones con título de inmunoglobulina humana anti-PD-1 mediante análisis en plasma con ELISA. Al día 56, los ratones con los títulos más elevados de inmunoglobulina humana anti-PD-1 se sometieron a inmunización de estímulo. 3 días después, los ratones se sacrificaron y se extrajo el bazo para la fusión. Se detectaron fusiones de hibridoma y se obtuvo un anticuerpo monoclonal murino mAb005. La secuencia de región variable de cadena pesada y la secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal murino mAb005 son las siguientes:

mAb005 HCVR

EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYMMSWVRQTPEKRLEWVATISG
GGANTYYPDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDALYYCARQLYYFDYW
GQGTTTLTVSS

SEQID NO: 9

mAb005 LCVR

DIQMTQSPASQSASLGEGVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKSPQLLIYTATSLA
DGVPSRFSGSGSGTKFSFKISLQAEDFVITYCQQVYSIPWTFGGGTKLEIK

SEQID NO: 10

Las secuencias de CDR son las siguientes:

Nombre	Secuencia	Numeración
HCDR1	SYMMS	SEQ ID NO: 3
HCDR2	TISGGGANTYYPDSVKG	SEQ ID NO: 4
HCDR3	QLYYFDY	SEQ ID NO: 5
LCDR1	LASQTIGTWLT	SEQ ID NO: 6
LCDR2	TATSLAD	SEQ ID NO: 7
LCDR3	QQVYSIPWT	SEQ ID NO: 8

Ejemplo 2: Detección de anticuerpos

Ensayo in vitro de unión ELISA de anticuerpos PD-1:

El anticuerpo PD-1 bloquea la vía de señalización de PD-1 y su ligando al unirse al dominio extracelular de PD-1. Se utiliza el ensayo ELISA in vitro para detectar la propiedad de unión del anticuerpo PD-1. Se coloca una capa de la proteína de fusión del dominio FC extracelular de PD-1 (PD-1 FC) biotinilada en placas de 96 pocillos al unirse a avidina de neutralización. Se utilizó la intensidad de señal luego de la adición del anticuerpo para determinar la propiedad de unión del anticuerpo y PD-1.

La avidina de neutralización (unión a biotina) se diluyó a 1 µl/ml con amortiguador PBS, se pipeteó a una placa de 96 pocillos con 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 16 horas - 20 horas a 4 °C. La placa de 96 pocillos se lavó una sola vez con PBST (PBS con PH 7,4, con tween20 al 0,05 %) luego se extrajo el amortiguador PBS, se incubó la placa y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con la adición de 120 µl/pocillo de PBST/1% de leche. Luego de la extracción de la solución de bloqueo, la placa se lavó con amortiguador PBST, luego se agregó 1 µg/ml de PD1-FC marcado con biotina que se diluyó con PBST/1 % de leche, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de la extracción de la solución de bloqueo, la placa se lavó 3 veces con amortiguador PBST, luego se agregó el anticuerpo PD-1 de prueba que se diluyó a una concentración adecuada con PBST/1 % de leche, y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Luego de la extracción del sistema de reacción, la placa se lavó 3 veces con amortiguador PBST, luego se agregaron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario anti-murino marcado con

HRP (The Jackson Laboratory) que se diluyó con PBST/1 % de leche, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavarse tres veces con PBST, se agregaron a la placa 100 µl/pocillo de TMB, y se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Luego se finalizó la reacción con 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 1M. El valor de absorbancia a 450 nm se leyó en una lectora de microplacas NOVOSTar; se calculó el valor de EC₅₀ de unión de ELISA.

Anticuerpo de prueba	ELISA, EC50,nM	
	PD-1 humana	PD-1 de cyno
mAb005	0,25	0,27

Los resultados demostraron que el anticuerpo mAb005 mostró una actividad de unión excelente a la PD-1Fc humana (PD-1 humana) y PD-1Fc de cynomolgus (PD-1 de cyno).

Ensayo de bloqueo in vitro de la unión del anticuerpo PD-1 y el ligando de PD-1:

PD-L1 en la superficie de una célula tumoral presenta un efecto de supresión sobre la proliferación de linfocitos T mediante la unión a PD-1 en la superficie de un linfocito T. El anticuerpo PD-1 bloquea la vía de señalización de PD-L1/PD-1 mediante la unión a PD-1, de modo que estimule la proliferación de linfocitos T. Se utiliza el ensayo de bloqueo de unión de PD-1/PD-L1 para detectar la actividad de bloqueo del anticuerpo PD-1 en la vía de señalización.

En este experimento, se recubrió una placa de 96 pocillos con una proteína de PD-1 dentro del dominio extracelular fusionada con FC (PD-1-FC) y se incubó con el anticuerpo PD-1 de prueba; luego se agregó PD-L1 marcado con biotina para la incubación. Luego de lavar la placa, se detectó la cantidad de unión de PD-L1 marcado con biotina; se calculó el valor IC₅₀ de bloqueo del anticuerpo PD-1 para la unión al ligando PD-L1.

Se diluyó PD-1-FC a 1 µg/ml con amortiguador CB de PH 9,6 (1,59 g de Na₂CO₃ y 2,93 g de NaHCO₃ se disolvieron en 1 L de agua destilada), se pipeteó en una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 16 horas - 20 horas a 4 °C.

La placa de 96 pocillos se lavó una sola vez con PBST (PBS con PH 7,4, con tween20 al 0,05 %) luego se extrajo el amortiguador PBS, se incubó la placa y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con 120 µl/pocillo de PBST/1% de leche. Luego de la extracción de la solución de bloqueo, la placa se lavó una vez con amortiguador PBST, luego se agregaron 90 µl del anticuerpo PD-1 de prueba que se diluyó a una concentración adecuada con diluyentes de muestra (PBS con PH 7,4 que contenía BSA al 5 %, Tween20 al 0,05 %), y se incubó durante 1 hora a 4 °C. Luego se agregaron concentraciones 10 X de PD-L1 marcado con biotina (Beijing Sino Biological Inc.) (10 µg/ml) a la placa a 10 µl/pocillo, se hicieron oscilar y se mezclaron mediante un oscilador, y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Luego de la extracción del sistema de reacción, la placa se lavó 6 veces con amortiguador PBST, luego se agregaron 100 ul/pocillo de polímero de estreptavidina–peroxidasa que se diluyó mediante PBST a una relación de 1:400, y se incubó con oscilación durante 50 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavarse 6 veces con PBST, se agregaron a la placa 100 µl/pocillo de TMB, y se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Luego se finalizó la reacción con una adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 1M. El valor de absorbancia a 450 nm se leyó en una lectora de microplacas NOVOSTar; se calculó el valor de IC₅₀ de bloqueo de PD-1 para la unión del ligando PD-L1.

Anticuerpo de prueba	Ensayo LBB
	IC50,nM
mAb005	1,13

El resultado mostró que el anticuerpo mAb005 era muy eficaz en el bloqueo de la unión de PD-L1 con PD-1.

Ejemplo 3: Ensayo de selectividad de unión del anticuerpo PD-1 in vitro

Para detectar la actividad de unión específica del anticuerpo PD-1 a otras proteínas de la familia PD-1, se utilizó CTLA4 humana y CD28 humana para los ensayos de unión. Mientras tanto, también se utilizó la PD-1 de ratones para los ensayos de unión, con la finalidad de determinar la diversidad del anticuerpo PD-1 para especies que no fueran humano/mono.

Proteínas de unión selectiva: PD-1 humana, ICOS humana, CTLA4 humana, CD28 humana y PD-1 de ratón, (Beijing Sino Biological Inc.), se diluyeron respectivamente a 1 µg/ml con amortiguador PBS, se pipetearon en una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejaron reposar durante 16 horas - 20 horas a 4 °C. La placa de 96 pocillos se lavó una sola vez con PBST (PBS con PH 7,4, con tween20 al 0,05 %) luego se extrajo el amortiguador PBS, se incubó la placa y se bloqueó durante 1 hora a temperatura ambiente con 120 µl/pocillo de PBST/1% de leche. Luego de la extracción de la solución de bloqueo, la placa se lavó 3 veces con amortiguador PBST, luego se agregó el anticuerpo PD-1 de prueba, y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Luego de la extracción del sistema de reacción, la placa se lavó 3 veces con PBST, luego se agregaron 100 µl/pocillo de anticuerpo secundario anti-murino marcado con HRP (The Jackson Laboratory) que se diluyó con PBST/1 % de leche, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBST, luego se agregaron 100 µl/pocillo de TMB, y se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Luego se finalizó la reacción con la adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 1M. El valor de absorbancia a 450 nm se leyó en una lectora de microplacas NOVOSTar.

Anticuerpo de prueba	PD1-FC humana	PD1-Fc de ratón	ICOS/Fc humana	CTLA4 humana	CD28 humana
mAb005	2,64	0,07	0,15	0,17	0,12

El resultado demostró que el anticuerpo mAb005 no presenta una actividad de unión específica a otras proteínas de la familia PD-1. Mientras tanto, mAb no tiene reactividad cruzada de especies con la PD-1 murina.

Ejemplo 4: Ensayo de unión celular in vitro del anticuerpo PD-1

FACS (selección de células activadas por fluorescencia) es un método de prueba para detectar la interacción de proteínas y células. La prueba se utiliza para detectar la actividad de unión del anticuerpo PD-1 a PD-1 natural expresada en la superficie celular. Las células utilizadas en la prueba son células CHO que expresan PD-1 en gran medida (ver Ejemplo 1, células CHO transfectadas con PD-1 (SEQ ID NO: 2)).

Las células CHO que expresaban PD-1 en gran medida se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, y el sedimento se recolectó y se suspendió con 10-15 ml de amortiguador de flujo previamente enfriado para el conteo celular. Las células se centrifugaron a 1000 rpm en tubos de centrífuga de 50 ml durante 5 minutos y se recolectaron. Luego de la extracción del sobrenadante, el sedimento se volvió a suspender con amortiguador de bloqueo enfriado previamente con una densidad de $0,5-1,0 \times 10^7$ células/ml. Luego de la incubación a 4 °C durante 30 minutos, la resuspensión se pipeteó en la placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo. La placa de 96 pocillos se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante. Se agregaron 100 µl anticuerpo primario a cada pocillo; las células se volvieron a suspender y se incubaron en la oscuridad durante 60 minutos a 4 °C. Luego del centrifugado y descarte del sobrenadante, se agregaron 100 µl de anticuerpo secundario marcado con FITC (BD Biosciences) diluido a 1:400. Las células se volvieron a suspender y se incubaron en la oscuridad durante 60 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con amortiguador de flujo, se resuspendieron y se fijaron con paraformaldehído al 1 % para el ensayo de citometría de flujo.

Anticuerpo de prueba	MFI			
	50 nM	5 nM	0,5 nM	0,05 nM
mAb005	468	319	71,2	14

Los resultados muestran que el anticuerpo mAb005 también puede unirse a PD-1 en la superficie celular.

Ejemplo 5: Ensayo cinético y de afinidad de unión in vitro

El método Biacore es un ensayo reconocido que detecta de forma objetiva la afinidad de interacción y cinética de las proteínas. Se analizó la afinidad caracterizada y la cinética de unión del anticuerpo PD-1 de prueba de la presente invención mediante Biacore (GE).

De acuerdo con las indicaciones de un kit proporcionado por Biacore, el anticuerpo PD-1 de prueba de la presente invención se unió de forma covalente a CM5 (GE) mediante el uso de un método de acoplamiento amino estándar. Luego se cargó a cada ciclo, de forma sucesiva, una serie concentraciones de gradiente de la proteína His de PD-1 (Beijing Sino Biological Inc.), que se diluyeron en el mismo amortiguador.

Luego de esto, las muestras se regeneraron con el reactivo regenerado del kit. Se monitoreó la cinética de unión del antígeno-anticuerpo durante 3 minutos y se monitoreó la cinética de disociación durante 10 minutos. Los datos obtenidos se analizaron con el software BIAevaluation de GE mediante el uso de un modelo de unión 1:1 (Langmuir). Se muestran en la siguiente tabla los valores Ka (kon), kd (koff) y KD determinados por el ensayo.

Anticuerpo de prueba	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
mAb005	1.057E+5	3.769E-4	3.566E-9

Los resultados muestran que el valor Kd de unión del anticuerpo mAb005 a PD-1 alcanzó los 3,57 nM.

Ejemplo 6 Prueba de citología in vitro

Se utiliza el ensayo de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas frescas afectadas por el anticuerpo para detectar la actividad celular del anticuerpo mAb005.

Se ajustó la densidad de las PBMC humanas frescas a 2×10^6 /ml, se colocaron en una placa de 6 pocillos a 2 ml/pocillo, y se incubaron durante 6 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Luego de la suspensión las células se descartaron, cada pocillo de células adherentes se mezcló con 2 ml de medio RPMI1640 que contenía 100 ng/ml de GM-CSF (factor biológico estimulante de colonias de granulocitos) y 100 ng/ml de IL-4, y 1 ml más de medio RPMI1640 que contenía 100 ng/ml de GM-CSF y 100 ng/ml de IL-4 luego de incubación durante 2 días, luego las células se cultivaron de forma continua durante 2 días, y se agregaron 100 ng/ml de TNF- α (factor de necrosis tumoral- α) a cada pocillo, y se cultivaron durante 2 días más para obtener células dendríticas maduras. Las células dendríticas y linfocitos T alogénicos se centrifugaron y resuspendieron respectivamente a una concentración de 1×10^6 /ml y 1×10^5 /ml, y se pipetearon a una placa de 96 pocillos a 100 μ l/pocillo, luego se agregaron 20 μ l/pocillo de anticuerpo que se diluyó a distintos gradientes de concentración con PBS, y las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante 5 días. Luego, se muestrearon 100 μ l de cultivo celular para

detectar la proliferación celular con el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®. El resultado se muestra en la Figura 1, que indica que el anticuerpo PD-1 mAb005 evaluado puede estimular de forma eficaz la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica humana, con una EC50 de 83 ng/ml. La muestra remanente se evaluó para detectar la secreción de la citocina IFN- γ . El resultado se muestra en la Figura 2, que demuestra que el anticuerpo PD-1 mAb005 evaluado puede estimular la proliferación de PBMC, y estimular al mismo tiempo de forma eficaz la secreción de la citocina IFN- γ , con una EC50 de 13 ng/ml.

Ejemplo 7: Humanización de anticuerpos murinos

Con respecto a las secuencias de la región variable de cadena ligera (LCVR de mAb005, SEQ ID NO: 10) y la región variable de cadena pesada (HCVR de mAb005, SEQ ID NO: 9) del anticuerpo mAb005, se seleccionaron las plantillas humanizadas que coincidieron mejor con su región no CDR en la base de datos de líneas germinales. La plantilla de cadena pesada del anticuerpo es IgHV3-7/JH6, seleccionada para FR1, FR2, FR3 de la cadena ligera de la línea germinal humana IGKV1-39 y FR4 de JK4, con la SEQ ID NO: 13; la plantilla de cadena ligera es IGKV1-39/JK4, seleccionada para FR1, FR2, FR3 de la cadena ligera de la línea germinal humana IGKV1-39 y FR4 de JK4, con la SEQ ID NO: 14.

Plantilla de cadena pesada de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 13):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQ
DGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGQGT
TVSS;

Plantilla de cadena ligera de la línea germinal humana (SEQ ID NO: 14):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS
SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFGGGTKVEIK .

La CDR del anticuerpo murino se injertó en la plantilla de humanización seleccionada, reemplazando la CDR de la plantilla humana, y luego se recombinó con la región constante de IgG4 para obtener un anticuerpo humanizado H005-1. Luego, en función de la estructura tridimensional del anticuerpo murino, se retromutaron residuos incrustados, residuos con interacción directa con la CDR y residuos que

influyen de forma significativa en la conformación de VL y VH, para obtener los anticuerpos humanizados H005-2, H005-3 y H005-4, cuyas secuencias son las siguientes.

Expresión del anticuerpo

H005-1 HC
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISG
GGANTYYPD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY
WGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKR
VESKYGP PCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE
VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEAL
HNHYTQKSLSLSLGK

SEQID NO: 11

H005-1 LC
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLA
DGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQID NO: 12

La secuencia HC del anticuerpo humanizado H005-1 con CDR murina injertada es (SEQ ID NO: 11), la secuencia LC del anticuerpo humanizado es (SEQ ID NO: 12). Los sitios que pueden afectar la actividad del anticuerpo se sometieron a mutaciones puntuales, cuyas secuencias son las siguientes:

	HC	LC
H005-1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
H005-2	SEQ ID NO: 11, G44R	SEQ ID NO: 12
H005-3	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12, A43S
H005-4	SEQ ID NO: 11, G44R	SEQ ID NO: 12, A43S

Los ADNc se sintetizaron de acuerdo con las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de cada anticuerpo humanizado (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y variantes de estos). Luego de digerirse los ADNc con XhoI y BamHI, los fragmentos de ADNc obtenidos se insertaron en vectores de expresión pcDNA3.1 (Life Technologies, n.º de catálogo V790-20) en sitios de restricción de BamHI/XhoI.

Se utilizaron los vectores de expresión y un reactivo de transfección PEI (Polysciences, Inc. n.º de cat. 23966) para transfectar las células HEK293 (Life Technologies, n.º de cat. 11625019) a 1:2, y las células transfectadas se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 4-5 días. Los anticuerpos expresados se recuperaron mediante centrifugado y se purificaron de acuerdo con un método convencional para obtener los anticuerpos humanizados de la presente invención.

Ejemplo 8: Datos de actividad de anticuerpos humanizados

Los anticuerpos humanizados se sometieron a un ensayo de unión ELISA (el método es el mismo que el del Ejemplo 2), a un ensayo de bloqueo de unión a ligandos (el método es el mismo que el del Ejemplo 2) y a un experimento de cinética de afinidad (el método es el mismo que el del Ejemplo 5) in vitro. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Anticuerpo de prueba	ELISA, EC50,nM	Ensayo LBB, IC50,nM	KD(M)
H005-1	0,11	1,27	2.79E-09
H005-2	0,14	1,27	2.98E-09
H005-3	0,15	1,33	2.45E-09
H005-4	0,14	1,36	3.89E-09

El resultado muestra que los anticuerpos humanizados H005-1, H005-2, H005-3 y H005-4 mantuvieron la actividad de unión a PD-1, con cinética de afinidad KD de 2,79, 2,98, 2,45 y 3,89 nM, respectivamente. De forma simultánea, todos los anticuerpos humanizados presentaron de forma eficaz una actividad de bloqueo contra la vía de PD-L1/PD-1.

Ejemplo 9: Inhibición del crecimiento de células tumorales mediante el anticuerpo PD-1

1. Materiales del experimento:

Células U87MG (células de glioma): adquiridas del banco celular de la Chinese Academy of Sciences, n. ° de cat. TCHu138;

PBMC (células mononucleares de sangre periférica) adquiridas del Shanghai Blood

Center;

CD3: adquiridas de Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-093-387;

CD28: adquiridas de Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-093-375;

Kit-8 de conteo celular: disponible de DOJINDO LABORATORIES, n.º de cat. CK04;

mIgG (control negativo): adquirido de SANTA CRUZ, n.º de cat. sc-2025; con una dosis de 1660 ng/ml.

2. Métodos experimentales:

1) Las células U87MG se cultivaron en medio EMEM con FBS al 10 % y P/S al 1 %, se incubaron en una placa de 96 pocillos, 1×10^4 células por pocillo.

2) El anticuerpo H005-1 se diluyó a distintos gradientes de concentración (se muestra en la abscisa de la Figura 3) con PBS, se agregó a la placa de 96 pocillos a 10 ul/pocillo, y se incubó a 37 °C, en una incubadora de CO₂ al 5 % durante 4 horas.

3) Luego de la adherencia celular, se agregaron 80 ul de suspensión celular de PBMC a cada pocillo con una densidad celular de 2×10^4 células/pocillo, y se agregaron 10 ul de anticuerpo CD3 y anticuerpo CD28 en cada pocillo; las concentraciones finales de anticuerpos CD3 y CD28 fueron ambas 500 ng/ml.

4) Luego de 72 horas de incubación a 37 °C, en la incubadora de CO₂ al 5 %, se agregaron 10 ul de CCK8 a cada pocillo para el desarrollo. 2 horas después se determinó la OD450.

3. Resultado:

El resultado se muestra en la Figura 3, en comparación con mIgG (control negativo), distintas concentraciones de anticuerpo PD-1 (H005-1) tuvieron un efecto de inhibición significativo sobre el crecimiento de las células U87MG, y la tasa de inhibición a la concentración mayor fue de alrededor de 30 %.

Ejemplo 10: Actividad de H005-1 sobre la proliferación de PBMC estimulada por tuberculina

Se detectó la actividad del anticuerpo humanizado H005-1 sobre la proliferación in vitro de PBMC estimulada por tuberculina.

A 15 ml de PBMC frescos, alrededor de 3×10^7 células, se agregaron 20 μ l de tuberculina (Shanghai BiYou Biotechnology, n.º de cat. 97-8800) y la mezcla se incubó durante 5 días a 37 °C, en la incubadora de CO₂ al 5 %. Al día 6, se centrifugaron las células cultivadas, y se resuspendieron en medio fresco con una densidad ajustada a 5×10^5 células/ml. Se colocaron 190 μ l de células resuspendidas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se agregó el anticuerpo humanizado H005-1 a los pocillos correspondientes de la placa de 96 pocillos a 10 μ l/pocillo. Al grupo de control y grupo en blanco se les agregaron 10 μ l de PBS. La placa de cultivo celular se incubó a 37 °C en la incubadora de CO₂ al 5 % y, 72 horas después, se determinó la proliferación de PBMC (Promega, n.º de cat. G7571) y secreción de IFN- γ (Neo Bioscience, n.º de cat. EHC102g). Los resultados son los siguientes:

Efecto de activación de la muestra de prueba sobre la secreción de IFN- γ y proliferación de PBMC estimulada con tuberculina

Muestra	EC50 de proliferación de linfocitos T (ng/ml)	EC50 de IFN- λ (ng/ml)
H005-1	15,95 $\pm$ 17,15	56,87 $\pm$ 48,53

Nota: n=4

Los resultados del experimento muestran que el anticuerpo humanizado H005-1 activa de forma excelente la secreción de IFN- γ y proliferación de PBMC exógena estimulada por tuberculina.

Ejemplo 11: Inhibición del tumor U-87MG inoculado de forma subcutánea mediante H005-1

Se inocularon 100 μ l de células U87 (5×10^6 células) de forma subcutánea en la costilla derecha de ratones SCID-Beige. Cuando el tumor creció hasta 80-100 mm³ luego de 7 a 10 días, se descartaron los ratones con un peso corporal o tumor demasiado grande o demasiado pequeño; los ratones SCID-Beige se dividieron de forma aleatoria en un grupo de 10 mg/kg de H005-1 y un grupo de 10 mg/kg de IgG humana de acuerdo con el volumen del tumor, donde cada grupo comprendía siete ratones (D0). Se mezclaron dos tipos de PBMC estimulados por el anticuerpo CD3 durante 3 días a una relación de 1:1, y se inyectaron en los tejidos tumorales a 5×10^5

células/60 ul; mientras tanto, el anticuerpo de prueba se inyectó por vía subcutánea, una vez cada 7 días para un total de 3 dosis. Se midieron los ratones para evaluar el volumen del tumor y se pesaron dos veces por semana. Se registraron los datos. El volumen del tumor (V) se calculó de la siguiente manera: $V = 1/2 \times a \times b^2$, donde a y b representan largo y ancho, respectivamente.

El resultado se muestra en la Figura 4: cambio del volumen del tumor luego del tratamiento, y en la Figura 5: cambio del peso de los ratones luego del tratamiento, lo que indica que el anticuerpo H005-1 inhibió de forma satisfactoria el crecimiento del tumor U87MG, y no tuvo ningún efecto sobre el peso corporal de los ratones.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo PD-1 o un fragmento de unión al antígeno de este, que comprende:
una región variable de cadena ligera que comprende al menos una LCDR que se selecciona de las secuencias que se muestran en: SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8; y
una región variable de cadena pesada que comprende al menos una región HCDR que se selecciona de las secuencias que se muestran en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
2. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR1 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6.
3. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR2 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 7.
4. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 8.
5. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR1 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3.
6. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR2 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 4.
7. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 5.

8. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente.
9. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.
10. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadena ligera comprende una LCDR1, una LCDR2 y una LCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente; y donde la región variable de cadena pesada comprende una HCDR1, una HCDR2 y una HCDR3 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente.
11. El anticuerpo PD-1 o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo murino o un fragmento de este.
12. El anticuerpo PD-1 o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de este es un anticuerpo quimérico o un fragmento de este.
13. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 12, donde la secuencia de región variable de cadena ligera del anticuerpo quimérico es: SEQ ID NO: 10.
14. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 12, donde la secuencia de región variable de cadena pesada del anticuerpo quimérico es: SEQ ID NO: 9.
15. El anticuerpo PD-1 o fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo humanizado o un fragmento de este.

16. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 15, donde la secuencia de FR de cadena ligera de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado se deriva de una secuencia de combinación de las cadenas ligeras de línea germinal humana IGKV1-39 y JK4, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 14, que comprende FR1, FR2 y FR3 de IGKV 1-39 y FR4 de JK4.
17. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 15, donde la secuencia de la cadena ligera del anticuerpo humanizado es una secuencia tal como se muestra en la SEQ ID NO: 12 o una variante de esta; donde la variante comprende preferentemente una mutación de 0-10 aminoácidos en la región variable de cadena ligera, más preferentemente A43S.
18. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 15, donde la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado comprende además una FR de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, o una variante de esta, preferentemente una FR de cadena pesada de IgG2 o IgG4 humana.
19. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 15, donde la secuencia de FR de cadena pesada de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado se deriva de una secuencia de combinación de las cadenas pesadas de línea germinal humana IgHV3-7 y JH6, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 13, que comprende FR1, FR2 y FR3 de IgHV3-7 y FR4 de JH6.
20. El anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de este de acuerdo con la reivindicación 15, donde la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo humanizado es una secuencia tal como se muestra en la SEQ ID NO: 11 o una variante de esta; donde la variante comprende preferentemente una mutación de 0-10 aminoácidos en la región variable de cadena pesada, más preferentemente G44R.
21. Una molécula de ADN que codifica el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.

22. Un vector de expresión que comprende la molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 21.
23. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 22.
24. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 23, donde la célula hospedadora es una bacteria, preferentemente *E. coli*.
25. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 23, donde la célula hospedadora es una levadura, preferentemente *Pichia pastoris*.
26. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo PD-1 o el fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
27. El uso del anticuerpo PD-1 o del fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, y la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por PD-1, donde la enfermedad o trastorno es preferentemente cáncer, más preferentemente cáncer que expresa PD-L1, más preferentemente cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer intestinal, cáncer renal, melanoma y cáncer de pulmón no microcítico y, más preferentemente, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma y cáncer renal.

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015 年 6 月 18 日 (18.06.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/085847 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2014/091090

(22) 国际申请日: 2014 年 11 月 14 日 (14.11.2014)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201310681942.6 2013 年 12 月 12 日 (12.12.2013) CN

(71) 申请人: 上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。

(72) 发明人: 袁纪军 (YUAN, Jijun); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。屈向东 (QU, Xiangdong); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。林菊芳 (LIN, Jufang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。叶鑫 (YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。曹国庆 (CAO, Guoqing); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。张连山 (ZHANG, Lianshan); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。张蕾 (ZHANG, Lei); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。杨莉 (YANG, Li); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

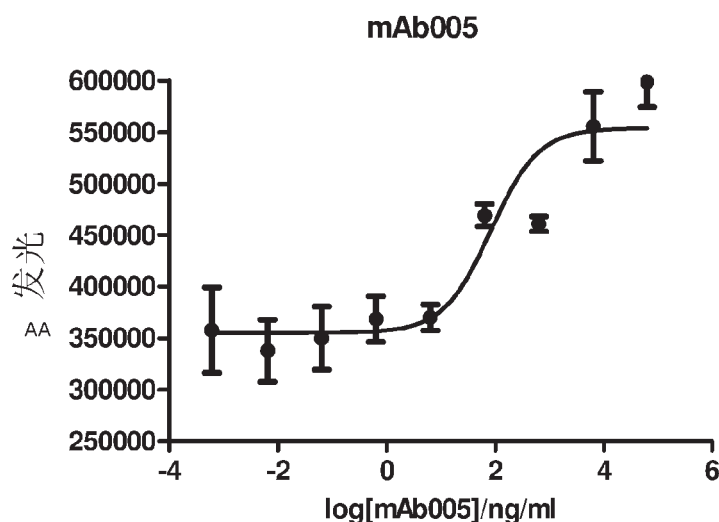
(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO. LTD); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

[见续页]

(54) Title: PD-1 ANTIBODY, ANTIGEN-BINDING FRAGMENT THEREOF, AND MEDICAL APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: PD-1 抗体、其抗原结合片段及其医药用途



AA LUMINESCENCE

图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: The present invention provides a human PD-1 antibody, an antigen-binding fragment thereof, and a medical application thereof, and further provides a chimeric antibody comprising a complementarity-determining region (CDR) of the antibody, a humanized antibody, a pharmaceutical composition comprising the human PD-1 antibody and the antigen-binding fragment thereof, and a purpose of the antibody in preparing medicine for treating diseases or symptoms.

(57) 摘要: 本发明提供了人 PD-1 抗体、其抗原结合片段及其医药用途, 还提供了包含所述抗体 CDR 区的嵌合抗体、人源化抗体、包含人 PD-1 抗体及其抗原结合片段的药物组合物, 以及所述抗体在制备用于治疗疾病或病症的药物中的用途。



GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

(84) **指定国** (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT,

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/091090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/70 (2006.01) i; C12N 15/81 (2006.01) i; C12N 1/21 (2006.01) i; C12N 1/19 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT and Key Words: HENGRUI MEDICINE; YUAN, Jijun; QU, Xiangdong; PD-1, antibody, mAb005 etc.

VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT and Key Words: YUAN, Jijun; QU, Xiangdong; programmed death-1, PD-1, mAb005, antibod+ etc.

Genbank; EMBL; STN and searched sequences: SEQ ID NOS: 3-14 etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102892785 A (UCB PHARMA SA), 23 January 2013 (23.01.2013), see embodiments 1-4	1-27
A	CN 1259961 A (GENENTECH INC.), 12 July 2000 (12.07.2000), see the whole document	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 February 2014 (02.02.2014)	Date of mailing of the international search report 11 February 2015 (11.02.2015)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Jinfeng Telephone No.: (86-10) 62412282

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/091090

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102892785 A	23 January 2013	TW 201134488 A	16 October 2011
		JP 2013521769 A	13 June 2013
		AR 080501 A1	11 April 2012
		EP 2545076 A1	16 January 2013
		US 2011229461 A1	22 September 2011
		WO 2011110621 A1	15 September 2011
CN 1259961 A	12 July 2000	SI 0971959 T1	30 June 2006
		ZA 9802907 A	09 October 1998
		DE 69842174 D1	21 April 2011
		TR 9902818 T2	22 May 2000
		EP 2336190 A3	05 October 2011
		EP 0971959 A1	19 January 2000
		CN 101210051 A	02 July 2008
		HK 1114621 A1	13 September 2013
		CN 101665536 A	10 March 2010
		EP 1695985 A3	22 November 2006
		SI 1695985 T1	30 June 2011
		DK 1787999 T3	15 November 2010
		DE 69832970 D1	02 February 2006
		CN 101210051 B	26 December 2012
		ES 2361267 T3	15 June 2011
		HK 1114622 A1	01 April 2011
		CN 101665536 B	03 July 2013
		EP 1695985 A2	30 August 2006
		AT 501170 T	15 March 2011
		SI 1787999 T1	31 December 2010
		CA 2286397 A1	15 October 1998
		PT 971959 T	31 May 2006
		PT 973804 E	30 March 2007
		SI 0973804 T1	30 June 2007
		NZ 500077 A	26 October 2001
		CN 101838328 A	22 September 2010
		SI 2301580 T1	31 May 2012
		BR 9809388 B1	04 June 2013
		IL 132239 D0	19 March 2001
		AU 740738 B2	15 November 2001
		DK 2301580 T3	14 May 2012
		AU 7102398 A	30 October 1998
		EP 2301580 B1	18 January 2012
		PT 1787999 E	11 November 2010
		ZA 9802908 A	21 January 1999
		DE 69841815 D1	16 September 2010
		AT 314395 T	15 January 2006
		IL 132240 A	05 September 2006
		EP 2301580 A9	14 September 2011
		CN 101210050 A	02 July 2008
		AT 541586 T	15 February 2012
		PT 1695985 E	06 June 2011
		ES 2349559 T3	05 January 2011
		WO 9845332 A3	03 December 1998

International application No.
PCT/CN2014/091090

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

PATENT COOPERATION TREATY

TRANSLATION

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To:

Date of mailing (day/month/year)	11.02.2015
-------------------------------------	-------------------

Applicant's or agent's file reference 740033CPCT	FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
--	--

International application No. PCT/CN2014/091090	International filing date (day/month/year) 14.11.2014	Priority date (day/month/year) 12.12.2013
---	---	---

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K16/28 (2006.01) i; C12N15/13 (2006.01) i; C12N15/70 (2006.01) i; C12N15/81 (2006.01) i; C12N1/21 (2006.01) i; C12N1/19 (2006.01) i; A61K39/395 (2006.01) i; A61P35/00 (2006.01) i

Applicant
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- | | | |
|-------------------------------------|--------------|--|
| ☒ | Box No. I | Basis of the opinion |
| ☐ | Box No. II | Priority |
| ☐ | Box No. III | Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability |
| ☐ | Box No. IV | Lack of unity of invention |
| ☒ | Box No. V | Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement |
| ☐ | Box No. VI | Certain documents cited |
| ☐ | Box No. VII | Certain defects in the international application |
| ☐ | Box No. VIII | Certain observations on the international application |

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/CN	Date of completion of this opinion	Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/CN2014/091090

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
☐ on paper
☒ in electronic form
 - b. (time)
☒ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/CN2014/091090

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>1-27</u>	YES
	Claims	<u>None</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>None</u>	YES
	Claims	<u>1-27</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-27</u>	YES
	Claims	<u>None</u>	NO

2. Citations and explanations:

[1] 1. Document

[2] Reference is made to the following document:

[3] D1: CN 102892785 A, 23 January 2013 (23.01.2013).

[4] 2. Novelty (PCT Article 33(2))

[5] D1 discloses a mouse monoclonal antibody CA051_00949 of human PD-1, a humanized improved antibody of the antibody, and uses of these antibodies (see examples 1-4). D1 does not disclose the antibody or the antigen-binding fragment thereof in claims 1-20, and does not disclose the DNA molecules, carriers, host cells, pharmaceutical compositions, and uses in claims 1-27. Therefore, claims 1-27 are novel.

[6] 3. Inventive step (PCT Article 33(3))

[7] Claim 1 sets forth a PD-1 antibody or an antigen-binding fragment thereof. D1, as the closest prior art

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/CN2014/091090

Box No. V

Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;
citations and explanations supporting such statement

document, differs from the technical solution claimed in claim 1 in that: the sequence of the antibody in claim 1 differs from the sequence of the antibody CA051_00949 in D1. On the basis of this feature, it can be determined that the problem claim 1 essentially attempts to solve is to provide another PD-1 antibody. However, D1 discloses the PD-1 antigen, and when the antigen is known, a common antibody preparation technique in the art is used to prepare and obtain a new monoclonal antibody of the antigen, and the technical effects can be expected. Therefore, the technical solution would be obvious to a person skilled in the art. Claim 1 lacks an inventive step. On the basis of the same reasons, claims 2-10 also lack an inventive step. D1 further discloses that the CA051_00949 is a mouse antibody, and also discloses the humanized antibody of the antibody, and furthermore, it is a common technique for performing humanized improvement on an antibody in the art to use the sequences of the light and heavy chains FR area of the humanized antibody to replace the corresponding FR area of the mouse antibody. Therefore, claims 11-20 also lack an inventive step. Insofar as the antibody in claims 1-20 lacks an inventive step, determining the encoded DNA molecule of the antibody, constructing an expression carrier, and transforming a host cell are common techniques in the art. Using the antibody to prepare a pharmaceutical composition or prepare a medicine for treating PD-1 mediated relevant diseases is also a common technical means that would be easily conceived of by a person skilled in the art. Therefore, the technical solutions of claims 21-27 would be obvious and lack an inventive step.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

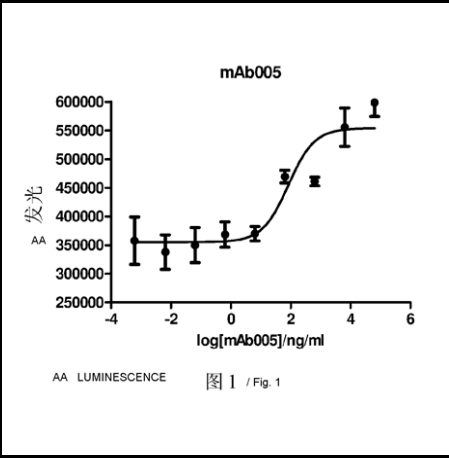
PCT/CN2014/091090

Box No. V	Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
-----------	--

[8] 4. Industrial applicability (PCT Article 33(4))

[9] The inventions of claims 1-27 can be made and used in the biomedical field, and therefore, claims 1-27 are industrially applicable under PCT Article 33(4).

 SUPERINTENDENCIA Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO PATENTE DE INVENCION PCT <u> X </u> MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 29-06-16 (51) Clasificación Internacional: C07K 16/28 (71) Solicitante(s): SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. y JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (72) Inventor(es): YUAN, Jijun; QU, Xiangdong; LIN, Jufang; YE, Xin; CAO, Guoqing; TAO, Weikang; ZHANG, Lianshan; ZHANG, Lei y YANG, Li. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 201310681942.6 12-12-13 CN (85) Fecha límite inicio fase nacional: 12-07-16 (86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 14-11-14 No. de solicitud: PCT/CN2014/091090 (87) Publicación internacional Fecha: 18-06-15 No. Publicación: WO 2015/085847 A1	
(54) Título: ANTICUERPO PD-1, FRAGMENTO DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE ESTE Y USO MÉDICO DE ESTE. (57) Resumen: Resumen.- La presente invención proporciona un anticuerpo PD-1 humano, un fragmento de unión al antígeno de este, y un uso médico de este, y proporciona además un anticuerpo quimérico y anticuerpos humanizados que comprenden una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo PD-1 humano y el fragmento de unión al antígeno de este, y el uso del anticuerpo en la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades o trastornos. Sector: Preparaciones médicas, anticuerpos.	



 SUPERINTENDENCIA Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION PCT <u> X </u> MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 26-06-16 (51) Clasificación Internacional: C07K 16/28 (71) Solicitante(s): SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. y JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (72) Inventor(es): YUAN, Jijun; QU, Xiangdong; LIN, Jufang; YE, Xin; CAO, Guoqing; TAO, Weikang; ZHANG, Lianshan; ZHANG, Lei y YANG, Li. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 201310681942.6 12-12-13 CN (85) Fecha límite inicio fase nacional: 12-07-16 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 14-11-14 No. de solicitud: PCT/CN2014/091090 (87) Publicación internacional Fecha: 18-06-15 No. publicación: WO 2015/085847 A1	
(54) Título: ANTICUERPO PD-1, FRAGMENTO DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE ESTE Y USO MÉDICO DE ESTE.	

(21) No. de solicitud:				(51) Int Cl:	C07K 16/28
(22) Fecha de solicitud:				(71) Solicitante(s):	SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD. y JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es):	YUAN, Jijun; QU, Xiangdong; LIN, Jufang; YE, Xin; CAO, Guoqing; TAO, Weikang; ZHANG, Lianshan; ZHANG, Lei y YANG, Li.
	201310681942.6	12-12-13	CN	(74) Apoderado:	ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85)	Fecha límite inicio fase nacional:			(87)	Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT			Fecha:	18-06-15
	Fecha de presentación de la solicitud:			No. publicación:	WO 2015/085847 A1
	No. de solicitud: PCT/CN2014/091090				
54) Título:					
“ANTICUERPO PD-1, FRAGMENTO DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE ESTE Y USO MÉDICO DE ESTE”					

Resumen - Sector(es):

Resumen.-

La presente invención proporciona un anticuerpo PD-1 humano, un fragmento de unión al antígeno de este, y un uso médico de este, y proporciona además un anticuerpo quimérico y anticuerpos humanizados que comprenden una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo PD-1 humano y el fragmento de unión al antígeno de este, y el uso del anticuerpo en la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades o trastornos.

Sector: Preparaciones médicas, anticuerpos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD., JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO.,LTD.

<120> Anticuerpo PD-1, fragmento de unión al antígeno de este y uso médico de este.

<130> 740033CPCT

<150> PCT/CN2014/091090

<151> 2014-11-14

<150> CN 201310681942.6

<151> 2013-12-12

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 399

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de fusión del dominio Fc extracelular de PD-1 recombinante

<400> 1

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ser Arg Cys Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg
20 25 30

Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu
35 40 45

Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser
50 55 60

Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys
65 70 75 80

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg
85 90 95

Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val
100 105 110

Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile
115 120 125

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
130 135 140

Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
145 150 155 160

Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Asp Lys Thr His
165 170 175

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
180 185 190

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
195 200 205

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
210 215 220

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
225 230 235 240

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
245 250 255

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
260 265 270

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
275 280 285

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
290 295 300

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
305 310 315 320

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
325 330 335

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
340 345 350

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
355 360 365

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
370 375 380

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395

<210> 2
<211> 288

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly

245250255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg

260265270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275280285

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus HCDR1

<400> 3

Ser Tyr Met Met Ser

15

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus HCDR2

<400> 4

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

151015

Gly

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus HCDR3

<400> 5

Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr

15

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus LCDR1

<400> 6

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Thr

1510

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus LCDR2

<400> 7

Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus LCDR3

<400> 8

Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 9
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus vVH

<400> 9

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Met Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus VL

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Gly Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp

20

25

30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile

354045

Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

505560

Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala

65707580

Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp

859095

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100105

<210> 11

<211> 443

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de cadena pesada del anticuerpo humanizado H005-1

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

151015

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

202530

Met Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

354045

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

505560

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65707580

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

859095

Ala Arg Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100105110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

115120125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130																	
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly		
145					150					155					160		
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		
				165					170					175			
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu		
			180					185					190				
Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr		
		195					200					205					
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro		
	210					215					220						
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro		
225					230					235					240		
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr		
				245					250					255			
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn		
			260					265					270				
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg		
		275					280					285					
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val		
	290					295					300						
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser		
305					310					315					320		
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys		
				325					330					335			
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu		
			340					345					350				
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe		
		355					360					365					
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu		
	370					375					380						
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe		
385					390					395					400		

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de cadena ligera del anticuerpo humanizado H005-1

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de región de marco de cadena pesada del anticuerpo humanizado

<400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 14
<211> 98
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de región de marco de cadena ligera del anticuerpo humanizado

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
85 90 95

Ile Lys

ANTICUERPO PD-1, FRAGMENTO DE UNIÓN AL ANTÍGENO DE ESTE Y USO MÉDICO DE ESTE

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un anticuerpo PD-1 humano, un fragmento de unión al antígeno de este, y un uso médico de este, y proporciona además un anticuerpo quimérico y anticuerpos humanizados que comprenden una región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo PD-1 humano y el fragmento de unión al antígeno de este, y el uso del anticuerpo en la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades o trastornos.

SECTOR: Preparaciones médicas, anticuerpos.

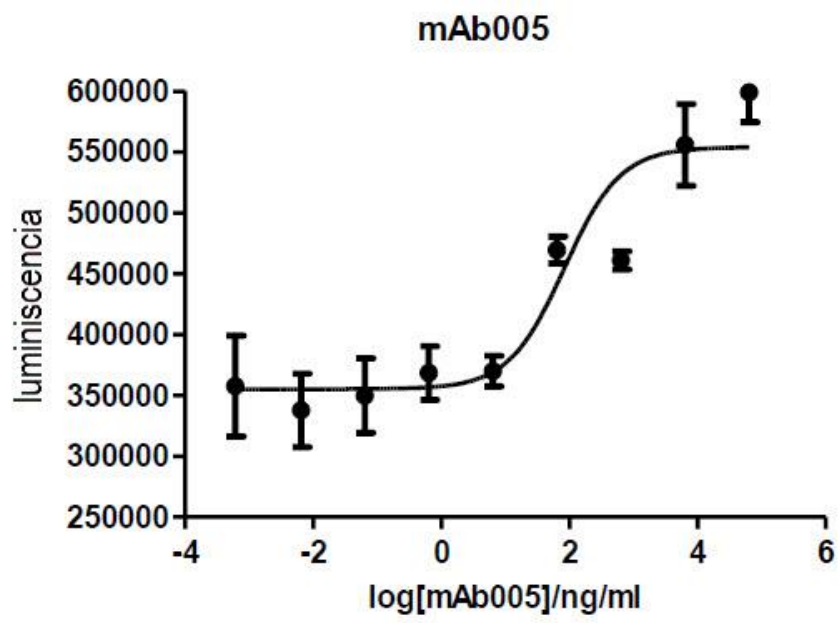


Figura 1

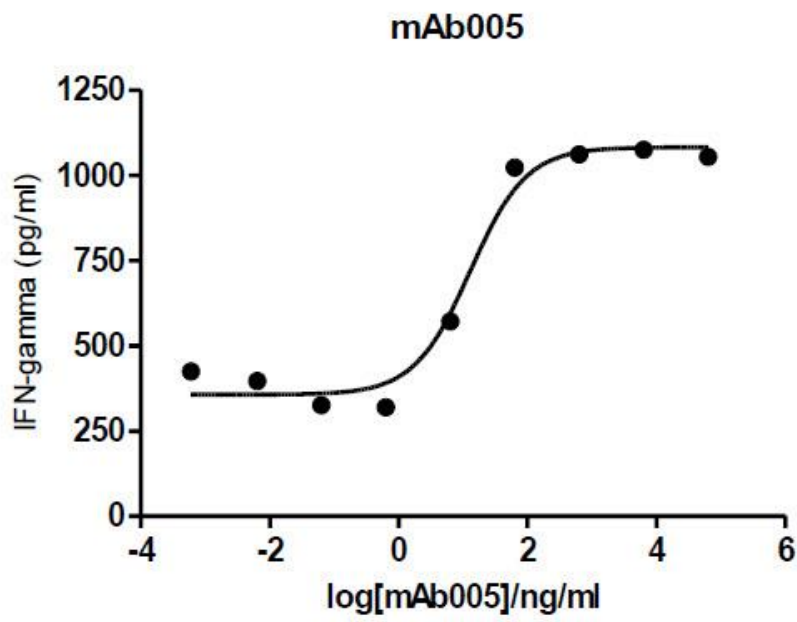
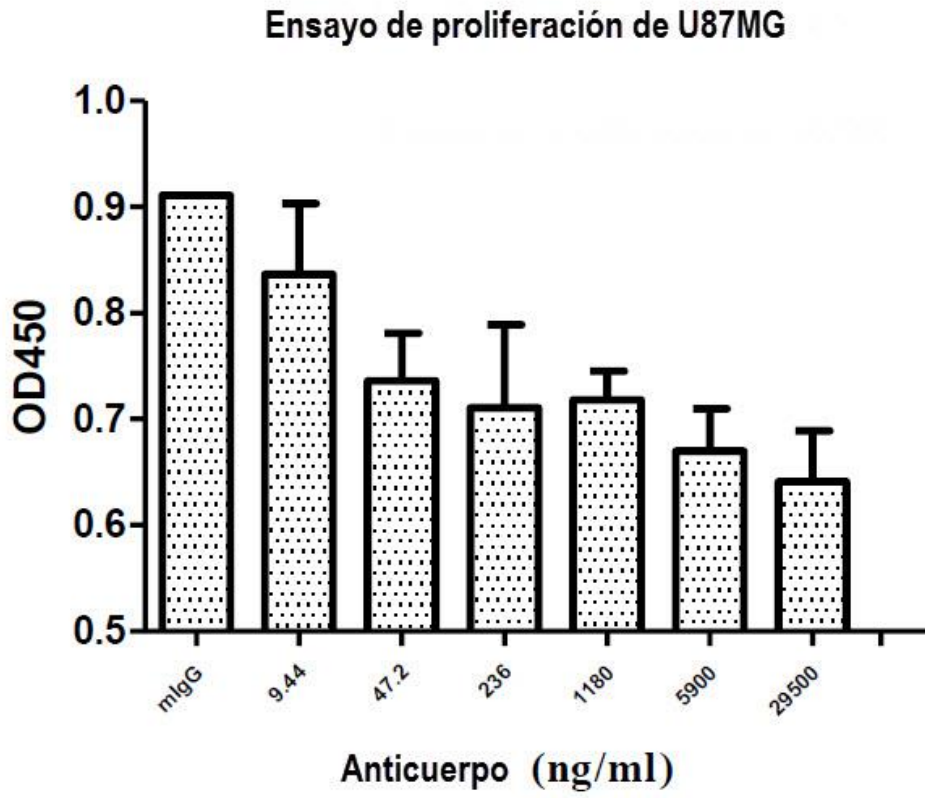
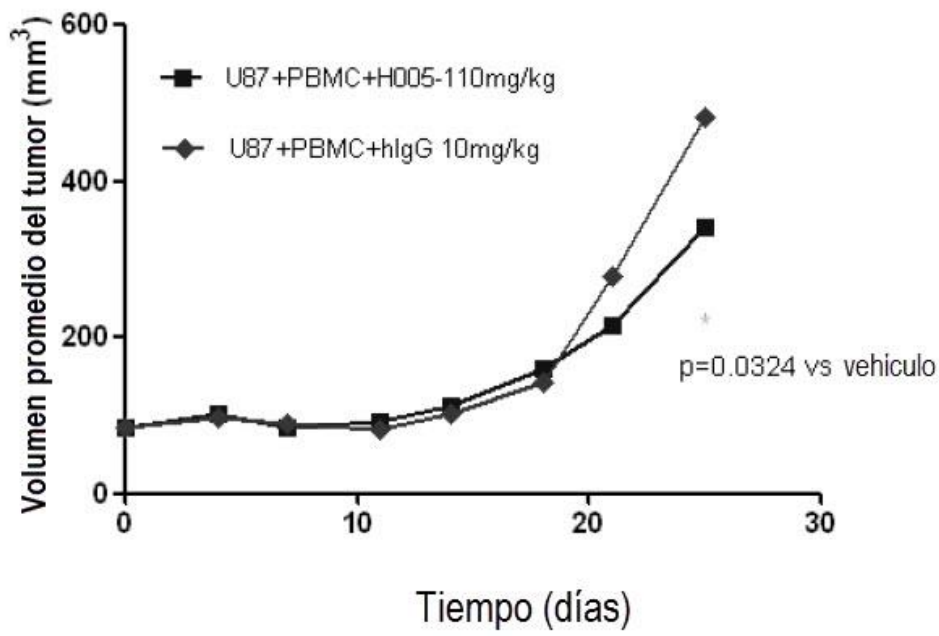
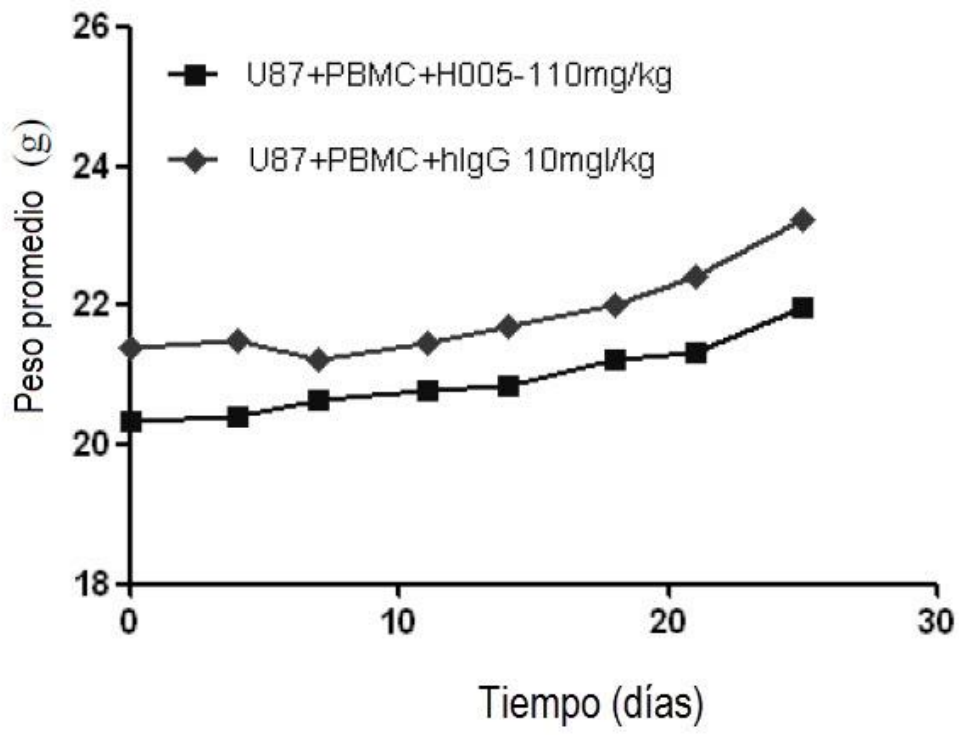


Figura 2

**Figura 3****Figura 4**

**Figura 5**