

ANTICUERPOS HUMANOS PARA PD-1

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos humanos que se unen específicamente al receptor inmunomodulador de muerte programada-1 (PD-1), y métodos terapéuticos y de diagnóstico para la utilización de esos anticuerpos.

DECLARACIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

[0002] La muerte programada-1 (PD-1) (también denominada CD279) es un receptor proteico de 288 aminoácidos expresado en células B y células T activadas, células asesinas naturales y monocitos. La PD-1 es un miembro de la familia CD28/CTLA-4 (antígeno de linfocitos T citotóxicos)/ICOS (co-estimulador inducible) de receptores co-inhibidores de células T (Chen *et al* 2013, Nat. Rev. Immunol. 13: 227-242). La función principal de la PD-1 es la de atenuar la respuesta inmune (Riley 2009, Immunol. Rev. 229: 114-125). La PD-1 tiene dos ligandos, PD-ligando1 (PD-L1) y PD-L2. La PD-L1 (CD274, B7H1) se expresa ampliamente tanto en tejidos linfoides como no linfoides tales como células T CD4 y CD8, células de linaje de macrófagos, tejidos periféricos, así como sobre células tumorales, células infectadas viralmente y células de tejidos autoinmunes. La PD-L2 (CD273, B7-DC) tiene una expresión más restringida que la PD-L1, que se expresa en macrófagos y células dendríticas activadas (Dong et al 1999, Nature Med.). La PD-L1 se expresa en la mayoría de los cánceres humanos, que incluyen melanoma, glioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, leucemia, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales y carcinoma hepatocelular, y puede ser inducible en casi todos los tipos de cáncer (Zou and Chen 2008, Nat. Rev. Immunol. 8: 467-77). La unión de PD-1 a sus ligandos resulta en disminución de proliferación de células T y secreción de citoquinas, que compromete respuestas inmunes humorales y celulares en enfermedades tales como cáncer, infección viral y enfermedad autoinmune. El bloqueo de unión de PD-1 para revertir la inmunosupresión se ha estudiado en la inmunoterapia viral y tumoral autoinmune (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519; Watanabe et al 2012, Clin. Dev. Immunol. Volume 2012, Article ID: 269756; Wang et al 2013, J. Viral Hep. 20: 27-39).

[0003] Las moléculas co-estimuladoras y co-inhibitorias de células T (denominadas de forma colectiva como moléculas de co-señalización) desempeñan un papel crucial en la regulación de activación de células T, diferenciación de subconjunto, función efectora y supervivencia (Chen et al 2013, Nature Rev. Immunol. 13: 227-242). Tras el reconocimiento de complejos de péptido-MHC cognados en células presentadoras de antígeno por el receptor de células T, los receptores de co-señalización se co-localizan con receptores de células T en la sinapsis inmune, donde se sinergizan con señalización de TcR para promover o inhibir la función y activación de células T (Flies et al 2011, Yale J. Biol. Med. 84: 409-421). La mejor respuesta inmune está regulada por un equilibrio entre las señales co-estimuladoras y co-inhibitorias (“puntos de control inmunes”) (Pardoll 2012, Nature 12: 252-264). La PD-1 funciona como un “punto de control inmune” en la mediación de tolerancia de células T periféricas y en evitar autoinmunidad. La PD-1 se une a PD-L1 o PD-L2 e inhibe la activación de células T. La capacidad de PD1 para inhibir

activación de células T se explota por tumores e infecciones virales crónicas para evadir la respuesta inmune. En las infecciones virales crónicas, la PD-1 se expresa altamente en células T específicas de virus y estas células T se “agotan”, con pérdida de funciones efectoras y capacidad proliferativa (Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276). La PD-L1 se expresa en una amplia variedad de tumores y estudios en modelos de animales han demostrado que la PD-L1 en tumores inhibe la activación de células T y lisis de células tumorales y puede llevar al aumento de muerte de células T específicas del tumor. La PD-1: sistema de PD-L1 también desempeña un papel importante en el desarrollo de células T reguladoras inducidas (Treg) y en el mantenimiento de la función de Treg (Francisco et al 2010, Immunol. Rev. 236. 219-242).

[0004] Dado que PD-1 desempeña un papel importante en la autoinmunidad, inmunidad tumoral e inmunidad infecciosa, es un objetivo ideal para inmunoterapia. El bloqueo de PD-1 con antagonistas, que incluyen anticuerpos monoclonales, se ha estudiado en tratamientos de cáncer e infecciones virales crónicas (Sheridan 2012, Nature Biotechnology 30: 729-730).

[0005] Los anticuerpos monoclonales para PD-1 se conocen en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en la Patente de EE.UU/publicación Nos. 8008449, 8168757, 20110008369, 20130017199, 20130022595, y en W02006121168, W020091154335, W02012145493, W02013014668, W02009101611, EP2262837, y EP2504028.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0006] La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que unen PD-1. Los anticuerpos de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para dirigirse a células T que expresan PD-1 y modular actividad de PD-1. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención son útiles para inhibir o neutralizar actividad de PD-1 y/o para estimular activación de células T, por ejemplo, en circunstancias donde la muerte mediada por células T es beneficiosa o deseable. En formas de realización alternativas, los anticuerpos potencian la actividad y/o unión de PD-1 y se pueden utilizar para inhibir la activación de células T. Los anticuerpos anti-PD-1 de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, se pueden incluir como parte de una molécula de unión a antígeno-multi-específica, por ejemplo, para modular la respuesta inmune y/o para dirigir los anticuerpos a un tipo específico de célula, tal como una célula tumoral, una célula de tejido autoinmune o una célula infectada viralmente. Los anticuerpos son útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como cáncer, infección viral y enfermedad autoinmune.

[0007] Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo de IgG1 o IgG4) o pueden comprender sólo una porción de unión a antígeno (por ejemplo, un Fab, F(ab')₂ o un fragmento scFv), y se pueden modificar para afectar a la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar funciones efectoras residuales (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933). En ciertas formas de realización, los anticuerpos pueden ser bi-específicos.

[0008] En un primer aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales recombinantes aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a PD-1. En ciertas formas de realización, los anticuerpos son completamente humanos. Ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 de la presente invención figuran en las Tablas 1-3 en el presente documento. La Tabla 1 establece los identificadores

de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (HCVRs), regiones variables de cadena ligera (LCVRs), regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1. La Tabla 2 establece los identificadores de secuencias de ácidos nucleicos de HCVRs, LCVRs, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1. La Tabla 3 establece los identificadores de secuencias de aminoácidos de secuencias de cadena ligera y cadena pesada de ejemplos de anticuerpos anti-PD-1.

[0009] La presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR que figuran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0010] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR que figuran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar a la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0011] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos LCVR y HCVR (HCVR/LCVR) que comprenden cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR que figuran en la Tabla 1, junto con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR que figuran en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR contenido dentro de cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 que figuran en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona del grupo que consiste en las SEC. ID. NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/202, 226/202, 234/202, 242/202, 250/202, 258/202, 266/202, 274/202, 282/202, 290/202, 298/186, 306/186 y 314/186. En ciertas formas de realización, el par secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona de una de SEC. ID. NOs: 130/138 (por ejemplo, H2M7795N), 162/170 (por ejemplo, H2M7798N), 234/202 (por ejemplo, H4xH9048P), o 314/186 (por ejemplo, H4xH9008P).

[0012] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprenden una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR1 que figuran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[0013] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR2 que figuran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar

de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[0014] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 que figuran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[0015] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR1 que figuran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[0016] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR2 que figuran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[0017] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 que figuran en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[0018] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 que figuran en la Tabla 1, junto con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 que se figuran en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCDR3/LCDR3 contenido dentro de cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 que figuran en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, el par de secuencia de aminoácidos HCDR3/LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEC. ID. NOs: 136/144 (por ejemplo, H2M7795N), 168/176 (por ejemplo, H2M7798N), 240/208 (por ejemplo, H4xH9048P) y 320/192 (por ejemplo, H4xH9008P).

[0019] La presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HC que figuran en la Tabla 3, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0020] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LC que

figuran en la Tabla 3, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0021] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos de HC y LC (HC/LC) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HC que figuran en la Tabla 3, junto con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LC que figuran en la Tabla 3. De acuerdo con ciertas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HC/LC contenido dentro de cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 que figuran en la Tabla 3. En ciertas formas de realización, el par de secuencia de aminoácidos HC/LC se selecciona del grupo que consiste en las SEC. ID. NOs: 330/331, 332/333, 334/335 y 336/337.

[0022] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un conjunto de seis CDRs (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenido dentro de cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 que figuran en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 establecida se selecciona del grupo que consiste en SEC. ID. NOs: 132-134-136-140-142-144 (por ejemplo, H2M7795N); 164-166-168-172-174-176 (por ejemplo, H2M7798N); 236-238-240-204-206-208 (por ejemplo, H4xH9048P); y 316-318-320-188-190-192 (por ejemplo, H4xH9008P).

[0023] En una forma de realización relacionada, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden un conjunto de seis CDRs (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenido dentro de un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR, tal como se define mediante cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 que figuran en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprenden el conjunto de secuencias de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contenido dentro de un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en las SEC. ID. NOs: 130/138 (por ejemplo, H2M7795N); 162/170 (por ejemplo, H2M7798N); 234/202 (por ejemplo, H4xH9048P); y 314/186 (por ejemplo, H4xH9008P). Los métodos y técnicas para la identificación de CDRs dentro de secuencias de aminoácidos HCVR y LCVR son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar para identificar las CDRs dentro de las secuencias de aminoácidos HCVR y/o LCVR especificadas que se describen en el presente documento. Los ejemplos de convenciones que se pueden utilizar para identificar los límites de las CDR incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición de Chothia y la definición de AbM. En términos generales, la definición de Kabat se basa en variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la localización de las regiones del bucle estructural y la definición de AbM es un acuerdo entre los enfoques de Kabat y de Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); y Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Las bases de datos públicas también están disponibles para la identificación de secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

[0024] La presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 que tienen un patrón modificado de glicosilación. En algunas formas de realización, la modificación para eliminar sitios de glicosilación indeseables puede ser útil, o un anticuerpo que carece de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacárido, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (véase Shield et al. (2002) JBC 277:26733). En otras aplicaciones, la modificación de galactosilación se puede realizar con el fin de modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0025] La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten por unión específica a PD-1 con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las CDRs de una HCVR y las CDRs de una LCVR, en donde cada HCVR y LCVR tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias HCVR y LCVR que figuran en la Tabla 1.

[0026] La presente invención también proporciona anticuerpos aislados y sus fragmentos de unión a antígeno que bloquean la unión de PD-1 a PD-L1 o PD-L2. En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 puede unirse al mismo epítipo en PD-1, tal como PD-L1, o se puede unir a un epítipo diferente en PD-1, tal como PD-L1.

[0027] En formas de realización alternativas, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que estimulan la unión de PD-1 a PD-L1. En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que unen PD-1, en donde los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos mejoran la unión de PD-1 a PD-L1. En algunas formas de realización, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden las CDRs de una HCVR, en donde HCVR tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC. ID. NOs: 2, 98 y 250; y las CDRs de LCVR, en donde LCVR tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC. ID. NOs: 10, 106 y 202. En algunas formas de realización, los anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado del grupo que consiste en SEC. ID. NOs: 2/10 (por ejemplo, H1M7789N), 98/106 (por ejemplo, H2M7791N) y 250/202 (por ejemplo, H4H9068P2).

[0028] La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a PD-1 de seres humanos y otras especies. En ciertas formas de realización, los anticuerpos pueden unirse a PD-1 humano y/o a PD-1 de cynomolgus.

[0029] La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten en forma cruzada para unirse a PD-1 con un anticuerpo de referencia o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las CDRs de una HCVR y las CDRs de una LCVR, en donde cada HCVR y LCVR tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias HCVR y LCVR que figuran en la Tabla 1.

[0030] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno que tiene una o más de las siguientes características: (a) bloquea la unión de PD-1 de PD-L1 o PD-L2; (b) se une específicamente a PD-1 humano y/o PD-1 de cynomolgus; (c) bloquea la regulación por disminución de células T inducidas por PD-1 y rescata la señalización de células T; (d) suprime el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en sujetos con cáncer de colon; (e) inhibe la proliferación de

células T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR); y (f) aumenta la secreción de IL-2 y/o interferón-gamma en un ensayo de MLR.

[0031] En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse específicamente a PD-1 de una manera agonista, es decir, puede mejorar o estimular la unión y/o actividad de PD-1; en otras formas de realización, el anticuerpo se puede unir específicamente a PD-1 de una manera antagonista, es decir, puede bloquear PD-1 de la unión a su ligando.

[0032] En ciertas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención son bi-específicos que comprenden una primera especificidad de unión a PD-1 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. El segundo epítipo objetivo puede ser otro epítipo en PD-1 o en una proteína diferente. En ciertas formas de realización, el epítipo objetivo puede estar en una célula diferente que incluye una célula T diferente, una célula B, una célula tumoral, una célula de tejido autoinmune o una célula infectada viralmente.

[0033] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-PD-1 o porciones de los mismos. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR que figuran en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCVR que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0034] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR que figuran en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCVR que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0035] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR1 que figuran en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR1 que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0036] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR2 que figuran en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR2 que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0037] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 que figuran en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR3

que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[0038] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR1 que figuran en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR1 que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0039] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR2 que figuran en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR2 que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0040] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 que figuran en la Tabla 1; en ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR3 que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[0041] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una HCVR, en donde la HCVR comprende un conjunto de tres CDRs (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), en donde la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3 establecida es tal como se define por cualquier de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 que figuran en la Tabla 1.

[0042] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una LCVR, en donde la LCVR comprende un conjunto de tres CDRs (es decir, LCDR1-LCDR2-LCDR3), en donde la secuencia de aminoácidos LCDR1-LCDR2-LCDR3 establecida es tal como se define por cualquiera de los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 que figuran en la Tabla 1.

[0043] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una HCVR como una LCVR, en donde la HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR que figuran en la Tabla 1 y en donde la LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR que figuran en la Tabla 1. En ciertas formas de realización, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCVR que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia de polinucleótidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCVR que figuran en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar de la misma que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma. En ciertas formas de realización de acuerdo con este aspecto de

la invención, la molécula de ácido nucleico codifica una HCVR y LCVR, en donde ambas HCVR y LCVR derivan del mismo anticuerpo anti-PD-1 que figura en la Tabla 1.

[0044] La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de cadena pesada que figuran en la Tabla 3. La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de cadena ligera que figuran en la Tabla 3.

[0045] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto una cadena pesada (HC) como una cadena ligera (LC), en donde la HC comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HC que figuran en la Tabla 3, y en donde LC comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos LC que figuran en la Tabla 3.

[0046] En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona vectores recombinantes de expresión capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-PD-1. Por ejemplo, la presente invención incluye vectores recombinantes de expresión que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de HCVR, LCVR y/o CDR tal como se establece en la Tabla 1. La presente invención también proporciona vectores recombinantes de expresión capaces de expresar un polipéptido que comprende una cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-PD-1. Por ejemplo, la presente invención incluye vectores recombinantes de expresión que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de cadena pesada o de cadena ligera tal como se establece en la Tabla 3. También se incluyen dentro del alcance de la presente invención células huésped en las que se han introducido tales vectores, así como métodos de producción de los anticuerpos o porciones de los mismos mediante el cultivo de las células huésped bajo condiciones que permiten la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y la recuperación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos así producidos.

[0047] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona moléculas de unión a antígeno multi-específicas y fragmentos de unión a antígeno de las mismas que comprenden una primera especificidad de unión a antígeno que se une específicamente a PD-1 y una segunda especificidad de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno seleccionado del grupo constituido por un antígeno específico de células tumorales, un antígeno específico de tejido autoinmune, un antígeno específico de células infectadas, un co-inhibidor de células T, un receptor de células T, un receptor de Fc, PD-L1 y PD-1. En ciertas formas de realización, la primera especificidad de unión a antígeno puede comprender tres CDRs derivadas de una HCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias HCVR en la Tabla 1 y tres CDRs derivadas de LCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de LCVR en la Tabla 1. En una forma de realización, la primera especificidad de unión a antígeno puede comprender el dominio extracelular de PD-L1. La segunda especificidad de unión a antígeno se puede dirigir a un antígeno en la misma célula que PD-1 o en una célula diferente del mismo tipo de tejido o de un tipo de tejido diferente. Por ejemplo, la molécula de unión a antígeno multi-específica puede unirse a una célula T en donde la primera especificidad de unión a antígeno puede unirse específicamente a PD-1 y la segunda especificidad de unión a antígeno puede unirse a un receptor de células T en la célula T. De manera alternativa, en otra forma de realización, la primera especificidad de unión a antígeno puede unirse

específicamente a PD-1 en una célula T y la segunda especificidad de unión a antígeno se puede dirigir a un antígeno/receptor en una célula B o un macrófago o célula presentadora de antígeno. En ciertas formas de realización, la segunda especificidad de unión a antígeno se puede dirigir a un antígeno asociado con un tejido autoinmune. En una forma de realización, la primera especificidad de unión a antígeno puede comprender un dominio extracelular de PD-L1 y la segunda especificidad de unión a antígeno puede unirse a otro epítipo en PD-1. En ciertas formas de realización, la primera especificidad de unión a antígeno se une a PD-1 con una afinidad inferior, por ejemplo, con una K_D mayor a 10^{-7} M, mayor a 10^{-6} M, mayor a 10^{-5} M o mayor a 10^{-4} M.

[0048] En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano recombinante o fragmento del mismo que une específicamente PD-1 y un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención presenta una composición que es una combinación de un anticuerpo anti-PD-1 y un segundo agente terapéutico. En una forma de realización, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combina de manera ventajosa con un anticuerpo anti-PD-1. Ejemplos de agentes que se pueden combinar de manera ventajosa con un anticuerpo anti-PD-1 incluyen, sin limitación, a otros agentes que se unen y/o modulan señalización de PD-1 (incluyendo otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, etc.) y/o agentes que no se unen directamente PD-1 pero no obstante modulan la activación de células inmunes. Las terapias de combinación adicionales y co-formulaciones que implican los anticuerpos anti-PD-1 de la presente invención se describen en el presente documento.

[0049] En un quinto aspecto, la invención proporciona métodos para modular la respuesta inmune en un sujeto, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención al sujeto en necesidad del mismo. En ciertas formas de realización, la invención proporciona métodos para mejorar la respuesta inmune en un sujeto, los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención que une PD-1 y bloquea la unión de PD-1 a PD-L1. En una forma de realización, la invención proporciona un método para estimular o potenciar la estimulación de células T en un sujeto. En una forma de realización, la invención proporciona métodos para inhibir una célula T-reguladora (Treg) en un sujeto, los métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de bloqueo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención al sujeto en necesidad del mismo. En ciertas formas de realización, el sujeto en necesidad del mismo puede sufrir de una enfermedad o trastorno tal como cáncer o infección viral. En formas de realización alternativas, la invención proporciona métodos para inhibir o suprimir la activación de células T en un sujeto, los métodos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de activación o fragmento del mismo de la invención al sujeto en necesidad del mismo. En una forma de realización, el sujeto puede sufrir de un trastorno o enfermedad autoinmune.

[0050] En un sexto aspecto, la invención proporciona métodos terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral en un sujeto que utiliza un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención, en donde los métodos terapéuticos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo de la invención al

sujeto en necesidad del mismo. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o afección que se mejora, alivia, inhibe o previene mediante la estimulación o inhibición de señalización o actividad de PD-1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se administra en combinación con un segundo agente terapéutico al sujeto en necesidad del mismo. El segundo agente terapéutico se puede seleccionar del grupo que consiste de un anticuerpo para otro co-inhibidor de células T, un anticuerpo para un antígeno de célula tumoral, un anticuerpo para un receptor de células T, un anticuerpo para un receptor Fc, un anticuerpo para un epítipo en una célula infectada viralmente, un anticuerpo para un antígeno autoinmune del tejido, un anticuerpo para PD-L1, un agente citotóxico, un fármaco anti-cáncer, un fármaco anti-viral, un fármaco anti-inflamatorio (por ejemplo, corticosteroides), agente quimioterapéutico, terapia de radiación, un inmunosupresor y cualquier otro fármaco o terapia conocida en la técnica. En ciertas formas de realización, el segundo agente terapéutico puede ser un agente que ayuda a contrarrestar o reducir cualquier posible efecto o efectos secundarios asociados con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, si se produce tal o tales efectos secundarios.

[0051] En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para suprimir el crecimiento tumoral. En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para mejorar la supervivencia de pacientes con cáncer. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer recurrente y/o primario, que incluyen cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma multiforme), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de próstata y cáncer de colon. Los métodos comprenden administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención en combinación con un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, aflibercept, bevacizumab), un inhibidor de angiopoyetina-2 (Ang2) (por ejemplo, un anticuerpo anti-Ang2 tal como nesvacumab), un inhibidor del gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3), un inhibidor de antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) (por ejemplo, ipilimumab), un agente quimioterapéutico y la terapia de radiación. Ejemplos adicionales de terapias/agentes terapéuticos adicionales que se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 de la invención para utilizar en el tratamiento del cáncer se describen en el presente documento.

[0052] El anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral, intramuscular o intracraneal. El anticuerpo o su fragmento se pueden administrar en una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto.

[0053] La presente invención también incluye el uso de un anticuerpo anti-PD-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se beneficiarían del bloqueo o mejora de la señalización y/o unión de PD-1.

[0054] Otras formas de realización serán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0055] La **Figura 1** es una vista esquemática del bioensayo de PD-1 abasado en luciferasa descrito en el Ejemplo 8 en el presente documento. Panel A: células Jurkat inactivas; Panel B: células Jurkat que se activan mediante el agrupamiento del receptor de células T (TcR) a través del anticuerpo bi-específico CD3xCD20; Panel C: activación de PD-1 que atenúa la respuesta en células Jurkat activadas; Panel D: bloqueo de PD-1 que rescata la respuesta en células Jurkat activadas.

[0056] La **Figura 2** ilustra el crecimiento tumoral y resultados de supervivencia para ratones implantados con células tumorales de colon-26 en el día 0 y tratados con las combinaciones indicadas de moléculas por inyección en los días 3, 6, 10, 13 y 19 (“modelo de tumor de tratamiento temprano”). La gráfica representa el volumen del tumor (en mm³) para los diferentes grupos experimentales en diversos puntos de tiempo después de implantación. Las flechas hacia arriba a lo largo del eje X indican la temporización de las inyecciones de tratamiento. “mIgG2a” es control del isotipo IgG2; “Fc” es control de Fc humano; “Trampa de VEGF” es aflibercept; “anti-PD-1” es RPMI-14 clon de PD-1 anti-ratón; “anti-PD-L1” es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 tal como se describe en el presente documento.

[0057] La **Figura 3** ilustra el crecimiento tumoral y resultados de supervivencia para ratones implantados con células tumorales de colon-26 en el día 0 y tratados con las combinaciones indicadas de moléculas por inyección en los días 3, 6, 10, 13 y 19 (“modelo de tumor de tratamiento temprano”). La gráfica muestra el volumen del tumor (en mm³) de ratones individuales en cada grupo experimental en el día 8 después de implantación. “mIgG2a” es control del isotipo IgG2; “Fc” es control de Fc humano; “Trampa de VEGF” es aflibercept; “anti-PD-1” es RPMI-14 clon de PD-1 anti-ratón; “anti-PD-L1” es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 tal como se describe en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0058] Antes de describir los presentes métodos, se ha de entender que esta invención no se limita a métodos específicos y condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente para el propósito de describir formas de realización específicas, y no se pretende que sea limitante, dado que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[0059] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entendería comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. A pesar de que cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o prueba de la presente invención, se describen ahora métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

[0060] El término “PD-1” se refiere a la proteína de muerte programada-1, un co-inhibidor de células T, también conocido como CD279. La secuencia de aminoácidos de PD-1 de longitud completa se proporciona en GenBank como el número de acceso NP_005009.2 y se también se denomina en el presente documento como SEC. ID. NO: 327. El término “PD-1” también incluye variantes de proteína de PD-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. NOs: 321, 322, 323, o 324. El término “PD-1” incluye PD-1 recombinante o un fragmento del mismo. El término también abarca PD-1 o un fragmento

de la misma acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia señal, tal como ROR1. Por ejemplo, el término incluye secuencias ejemplificadas por las SEC. ID. NO: 323 o 324, que comprenden un Fc de ratón (mIgG2a) o Fc humano (hIgG1) en el C-terminal, acoplado a residuos de aminoácidos 25-170 de PD-1 de longitud completa con un cambio C93S. Las variantes proteicas, tal como se ejemplifican por la SEC. ID. NO: 321, comprenden una etiqueta de histidina en el C-terminal, acoplado a residuos de aminoácidos 25-170 de PD-1 de longitud completa. A menos que se especifique como procedente de una especie no humana, el término “PD-1” significa PD-1 humano.

[0061] La PD-1 es un miembro de la familia CD28/CTLA-4/ICOS de los co-inhibidores de células T. La PD-1 es una proteína de 288 aminoácidos con un dominio N-terminal extracelular que es tipo IgV, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que contiene un motivo de inhibición inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y un motivo de cambio inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM) (Chattopadhyay et al 2009, Immunol. Rev.). El receptor de PD-1 tiene dos ligandos, PD-ligando-1 (PD-L1) y PD-L2.

[0062] El término “PD-L1” se refiere al ligando del receptor PD-1, también conocido como CD274 y B7H1. La secuencia de aminoácidos de PD-L1 de longitud completa se proporciona en GenBank como el número de acceso NP 054862.1, y en el presente documento se denomina como SEC. ID. NO: 328. El término también abarca PD-L1 o un fragmento del mismo acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia señal tal como ROR1. Por ejemplo, el término incluye secuencias ejemplificadas por las SEC. ID. NO: 325 o 326, que comprende un Fc de ratón (mIgG2a) o Fc humano (hIgG1) en el C-terminal, que se acoplan a residuos de aminoácidos 19-239 de PD-L1 de longitud completa. La PD-L1 es una proteína de 290 amino ácidos con un dominio extracelular tipo IgV, un dominio transmembrana y un dominio intracelular altamente conservado de aproximadamente 30 aminoácidos. La PD-L1 se expresa constitutivamente en muchas células tales como células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos y células B) y sobre células hematopoyéticas y no hematopoyéticas (por ejemplo, células endoteliales vasculares, islotes pancreáticos y sitios de privilegio inmune). La PD-L1 se expresa también en una amplia variedad de tumores, células infectadas viralmente y tejido autoinmune, y es un componente del medio inmunosupresor (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519).

[0063] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “co-inhibidor de célula T” se refiere a un ligando y/o receptor que modula la respuesta inmune a través de activación o supresión de células T. El término “co-inhibidor de célula T”, también conocido como molécula de co-señalización de células T, incluye, pero no se limita a, proteína gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3, también conocido como CD223), antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4), atenuador de linfocitos B y T (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, la inmunoglobulina de células T y mucina 3 (TIM3), inmunoreceptor de células T con inmunoglobulina y ITIM (TIGIT; también conocido como VSIG9), leucocito asociado al receptor similar a inmunoglobulina 1 (LAIR1; también conocido como CD305), coestimulador de células T inducible (ICOS, también conocido como CD278), supresor de Ig de dominio V de activación de células T (VISTA) y CD160.

[0064] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “receptor de Fc” se refiere a la proteína receptora de superficie que se encuentra en las células inmunes incluyendo linfocitos B, células asesinas naturales, macrófagos, basófilos, neutrófilos y células cebadas, que tienen una especificidad de unión para la región Fc de un anticuerpo. El término “receptor de Fc” incluye, pero no se limita a, un receptor Fcγ [por ejemplo,

Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32), Fc γ RIIB (CD32), Fc γ RIIIA (CD16a) y Fc γ RIIIB (CD16b)], receptor Fc ϵ (por ejemplo, Fc ϵ RI o CD89) y receptor FC ϵ [por ejemplo, Fc ϵ RI y FceRII (CD23)].

[0065] El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces disulfuro (es decir, “moléculas completas de anticuerpo”), así como multímeros de los mismos (por ejemplo, IgM) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada (“HCVR” o “V_H”) y una región constante de cadena pesada (compuesta por dominios C_H1, C_H2 y C_H3). Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (“LCVR o” V_L”) y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En ciertas formas de realización de la invención, las FRs del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) pueden ser idénticos a las secuencias de la línea germinal humana, o pueden modificarse de forma natural o artificial. Una secuencia de consenso de aminoácidos se puede definir sobre la base de un análisis de lado a lado de dos o más CDRs.

[0066] También es posible la sustitución de uno o más residuos de CDR u omisión de una o más CDRs. Los anticuerpos se han descrito en la literatura científica en donde una o dos CDRs se pueden prescindir de la unión. Padlan et al. (1995 FASEB J. 9: 133-139) analizó las regiones de contacto entre anticuerpos y sus antígenos, en base a las estructuras cristalinas publicadas, y concluyó que sólo aproximadamente de un quinto a un tercio de residuos de CDR en realidad contacta con el antígeno. Padlan también encontró muchos anticuerpos en los que una o dos CDRs no tenían aminoácidos en contacto con un antígeno (véase también, Vajdos et al. 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

[0067] Los residuos de CDR que no contactan con el antígeno se pueden identificar en base a estudios anteriores (por ejemplo, a menudo no se requieren residuos H60-H65 en CDRH2), de regiones de CDRs de Kabat que se encuentran fuera de CDR de Chothia, por modelado molecular y/o empíricamente. Si una CDR o residuo(s) de la misma se omite, por lo general se sustituye con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en la otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de tales secuencias. Las posiciones para sustitución dentro de las CDRs y aminoácidos para sustituir también se pueden seleccionar empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas.

[0068] Los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 completamente humanos descritos en el presente documento pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones en el marco y/o regiones CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de la línea germinal correspondientes. Tales mutaciones pueden determinarse fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento para las secuencias de la línea germinal disponibles de, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos

descritas en el presente documento, en donde uno o más aminoácidos dentro de una o más regiones de CDR y/o marco se mutan al o a los residuos correspondientes de la secuencia de la línea germinal de la que se derivó el anticuerpo, o al o a los residuos correspondientes de otra secuencia de la línea germinal humana, o a una sustitución de aminoácidos conservadora del o de los residuos de línea germinal correspondientes (tales cambios en la secuencia se denominan en el presente documento colectivamente como “mutaciones en línea germinal”). Una persona normalmente versada en la técnica, a partir de las secuencias de región variable de la cadena pesada y ligera descritas en este documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de las mismas. En ciertas formas de realización, todos los residuos de marco y/o CDR dentro de los dominios V_L y/o V_H están mutados de nuevo a los residuos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que se derivó el anticuerpo. En otras formas de realización, sólo ciertos residuos están mutados de nuevo a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, solamente los residuos mutados se encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o sólo los residuos mutados que se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras formas de realización, uno o más de los residuos de CDR y/o marcos están mutados al o a los correspondientes residuos de una secuencia diferente de la línea germinal (es decir, una secuencia de la línea germinal que es diferente de la secuencia de la línea germinal de la que el anticuerpo se derivó originalmente). Además, los anticuerpos de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de línea germinal dentro de las regiones de marco y/o CDR, por ejemplo, en donde determinados residuos individuales se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal específica, mientras que algunos otros residuos que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden probar fácilmente para una o más propiedades deseadas, tales como, especificidad de unión mejorada, aumento de afinidad de unión, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o aumentadas (según sea el caso), inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno obtenidos de esta manera general están comprendidos dentro de la presente invención.

[0069] La presente invención también incluye anticuerpos monoclonales anti-PD-1 completamente humanos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en el presente documento que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustituciones conservadoras de aminoácidos en relación a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR descritas en el presente documento.

[0070] El término “anticuerpo humano”, tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los mAbs humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por

ejemplo en las CDRs y, en especial, CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, tal como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir mAbs en donde las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamíferos (por ejemplo, de ratón), se han injertado en las secuencias de FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos de forma recombinante en un mamífero no humano o en células de un mamífero no humano. El término no pretende incluir anticuerpos aislados de o generados en un sujeto humano.

[0071] El término “recombinante”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención creados, expresados, aislados u obtenidos por tecnologías o métodos conocidos en la técnica tal como la tecnología de ADN recombinante, que incluye, por ejemplo, empalme de ADN y expresión transgénica. El término se refiere a anticuerpos expresados en un mamífero no humano (incluyendo mamíferos no humanos transgénicos, por ejemplo, ratones transgénicos), o un sistema de expresión de células (por ejemplo, células CHO) o aislados de una genoteca de anticuerpo humano combinatoria recombinante.

[0072] El término “moléculas de unión a antígeno multi-específicas”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas de unión a antígeno bi-específicas, tri-específicas o multi-específicas y fragmentos de unión a antígenos de las mismas. Las moléculas de unión a antígeno multi-específicas pueden ser específicas para diferentes epítomos de un polipéptido objetivo o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para epítomos de más de un polipéptido objetivo. Una molécula de unión a antígeno multi-específica puede ser un solo polipéptido multifuncional o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que se encuentran covalente o no covalentemente asociados entre sí. El término “moléculas de unión a antígeno multi-específicas” incluye anticuerpos de la presente invención que se pueden relacionar a o co-expresar con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo puede estar ligado funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como una proteína o fragmento de la misma para producir una molécula de unión a antígeno bi-específica o multi-específica con una segunda especificidad de unión. De acuerdo con la presente invención, el término “moléculas de unión a antígeno multi-específicas” también incluye anticuerpos bi-específicos, tri-específicos o multi-específicos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas formas de realización, un anticuerpo de la presente invención está funcionalmente ligado a otro anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para producir un anticuerpo bi-específico con una segunda especificidad de unión. Los anticuerpos bi-específicos y multi-específicos de la presente invención se describen en el presente documento.

[0073] El término “se une específicamente” o “se une específicamente a”, o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación en equilibrio de al menos aproximadamente 1×10^{-8} M o menos (por ejemplo, una K_D menor indica una unión más fuerte). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón de superficie y similares. Tal como se describe en el presente documento, los anticuerpos se han identificado por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, BIACORETM, que se unen específicamente a PD-1. Además, los anticuerpos multi-

específicos que se unen a un dominio en PD-1 y uno o más antígenos adicionales o uno bi-específico que se une a dos regiones diferentes de PD-1 se consideran, sin embargo, anticuerpos que “se unen específicamente”, tal como se utiliza en el presente documento.

[0074] El término anticuerpo de “alta afinidad” se refiere a aquellos mAbs que tienen una afinidad de unión a PD-1, expresado como K_D , de al menos 10^{-7} M; preferentemente 10^{-8} M; más preferentemente 10^{-9} M, incluso más preferentemente 10^{-10} M, incluso más preferentemente 10^{-11} M, según se mide mediante resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, BIACORE™ o ELISA de afinidad de solución.

[0075] Por el término “constante de disociación lenta”, “Koff o “kd” se entiende un anticuerpo que se disocia de PD-1, con una constante de velocidad de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, preferentemente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, tal como se determina mediante la resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, BIACORE™.

[0076] Los términos “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo, y similares, tal como se utiliza en el presente documento, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, obtenibles enzimáticamente, sintéticos, o modificados genéticamente que se unen específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los términos “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo o “fragmento de anticuerpo”, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conserva la capacidad de unirse a PD-1.

[0077] En formas de realización específicas, el anticuerpo o fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden conjugar con un resto tal como un ligando o un resto terapéutico (“inmunoconjugado”), tal como un antibiótico, un segundo anticuerpo anti-PD-1, o un anticuerpo para otro antígeno tal como un antígeno específico de tumor, un antígeno autoinmune del tejido, un antígeno de célula infectada con un virus, un receptor de Fc, un receptor de células T, o un co-inhibidor de células T, o una inmunotoxina, o cualquier otro resto terapéutico útil para el tratamiento de una enfermedad o afección que incluye cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral crónica.

[0078] Un “anticuerpo aislado”, tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos (Abs) que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1, o un fragmento del mismo, está sustancialmente libre de Abs que une específicamente a antígenos diferentes de PD-1).

[0079] Un “anticuerpo bloqueante” o un “anticuerpo neutralizante”, tal como se utiliza en el presente documento (o un “anticuerpo que neutraliza la actividad de PD-1” o un “anticuerpo antagonista”), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a PD-1 resulta en la inhibición de al menos una actividad biológica de PD-1. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede prevenir o bloquear la unión de PD-1 a PD-L1.

[0080] Un “anticuerpo activador” o un “anticuerpo potenciador”, tal como se utiliza en el presente documento (o un “anticuerpo agonista”), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a PD-1 resulta en el aumento o la estimulación de al menos una actividad biológica de PD-1. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede aumentar la unión de PD-1 a PD-L1.

[0081] El término “resonancia de plasmón de superficie”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la detección de alteraciones en

concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo, utilizando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ).

[0082] El término “ K_D ”, tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno específico.

[0083] El término “epítopo” se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión a antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocido como un paratopo. Un solo antígeno puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas en un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. El término “epítopo” se refiere también a un sitio en un antígeno al que las células B y/o T responden. También se refiere a una región de un antígeno que se une a un anticuerpo. Los epítopos pueden definirse como estructurales o funcionales. Los epítopos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítopos estructurales y tienen aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítopos también pueden ser conformacionales, es decir, compuestos de aminoácidos no lineales. En ciertas formas de realización, los epítopos pueden incluir determinantes que son agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo o grupos sulfonilo y, en ciertas formas de realización, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas.

[0084] El término “identidad sustancial” o “sustancialmente similar”, cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinean óptimamente con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiados con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 90%, y más preferentemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases nucleotídicas, medidas por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o GAP, tal como se trata a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene la misma o sustancialmente similar secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

[0085] Tal como se aplica a polipéptidos, el término “identidad sustancial” o “sustancialmente similar” significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos de hendidura por defecto, comparten al menos 90% de identidad de secuencia, incluso más preferentemente al menos 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia. De modo preferente, las posiciones de residuos que no son idénticas, se diferencian por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una en la que un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los versados en la técnica. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, que se incorpora en el presente documento como referencia. Ejemplos de grupos de aminoácidos

que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales alifáticas-hidroxilo: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. De manera alternativa, una sustitución conservadora es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrito en Gomet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45, que se incorpora en el presente documento como referencia. Un reemplazo “moderadamente conservador” es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

[0086] La similitud de secuencia de polipéptidos se mide normalmente utilizando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas compara secuencias similares utilizando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como GAP y BESTFIT que se pueden utilizar con los parámetros por defecto para determinar homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una mutante de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también se pueden comparar utilizando FASTA con parámetros por defecto o recomendados; un programa de GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, utilizando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 y (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

[0087] Por la frase “cantidad terapéuticamente efectiva” se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá de la finalidad del tratamiento y será determinable por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[0088] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “sujeto” se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, en necesidad de alivio, prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como infección viral crónica, cáncer o enfermedad autoinmune.

[0089] Tal como se utiliza en el presente documento, “fármaco anti-cáncer” significa cualquier agente útil para tratar el cáncer, incluyendo, pero no limitado a, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimitóticos, procarbazona, hidroxurea, asparaginasa, corticosteroides, mitotano (O, P’-(DDD)), agentes biológicos (por ejemplo, anticuerpos e interferones) y radiactivos. Tal como se utiliza en el presente documento, “una citotoxina o agente citotóxico”, también se

refiere a un agente quimioterapéutico y se refiere a cualquier agente que es perjudicial para las células. Ejemplos incluyen Taxol® (paclitaxel), temozolamida, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, cisplatino, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, coichicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi anthracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dihidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

[0090] Tal como se utiliza en el presente documento, el término “fármaco anti-viral” se refiere a cualquier fármaco o terapia utilizada para tratar, prevenir o mejorar una infección viral en un sujeto huésped. El término “fármaco antiviral” incluye, pero no se limita a la zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina, analgésicos y corticoides. En el contexto de la presente invención, las infecciones virales incluyen infecciones crónicas a largo plazo causadas por virus, incluyendo, pero sin limitarse a, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus del papiloma humano (VHP), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV).

[0091] Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen específicamente a PD-1 y modulan la interacción de PD-1 con PD-L1. Los anticuerpos anti-PD-1 pueden unirse a PD-1 con alta afinidad o con baja afinidad. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden estar bloqueando anticuerpos en los que los anticuerpos se pueden unir a PD-1 y bloquear la interacción de PD-1 con PD-L1. En algunas formas de realización, los anticuerpos de bloqueo de la invención pueden bloquear la unión de PD-1 a PD-L1 y/o estimular o potenciar la activación de las células T. En algunas formas de realización, los anticuerpos de bloqueo pueden ser útiles para estimular o potenciar la respuesta inmune y/o para el tratamiento de un sujeto que padece cáncer o una infección viral crónica. Los anticuerpos cuando se administran a un sujeto en necesidad de los mismos pueden reducir la infección crónica por un virus tal como el VIH, LCMV o VHB en el sujeto. Ellos se pueden utilizar para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto. Se pueden utilizar solos o como complemento de la terapia con otros restos terapéuticos o modalidades conocidas en la técnica para el tratamiento de cáncer o infección viral.

[0092] En otras formas de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden estar activando anticuerpos, donde los anticuerpos se pueden unir a PD-1 y mejorar la interacción de PD-1 y PD-L1. En algunas formas de realización, los anticuerpos de activación pueden potenciar la unión de PD-1 de PD-L1 y/o inhibir o suprimir la activación de células T. Los anticuerpos de activación de la presente invención pueden ser útiles para inhibir la respuesta inmune en un sujeto y/o para el tratamiento de enfermedad autoinmune.

[0093] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 pueden ser moléculas de unión a antígeno multi-específica, en donde comprenden una primera especificidad de unión a PD-1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno que se selecciona del grupo que consiste en otro co-inhibidor de células T, un antígeno de tejido autoinmune, receptor de células T, receptor de Fc, receptor de células T, PD-L1 y un epítopo diferente de PD-1.

[0094] En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención se obtienen a partir de ratones inmunizados con un inmunógeno primario, tal como PD-1 de longitud completa [Véase el número de acceso GenBank NP_005009.2 (SEC. ID. NO: 327)] o con

una forma recombinante de PD-1 o fragmentos de PD-1 humanos modificados (SEC. ID. NOs: 321, 323, o 324) o con fragmentos de PD-1 de cynomolgus modificados (SEC. ID. NO: 322), seguido de inmunización con un inmunógeno secundario o con un fragmento inmunológicamente activo de PD-1.

[0095] El inmunógeno puede ser un fragmento inmunogénico y/o biológicamente activo de PD-1 o ADN que codifica su fragmento activo. El fragmento puede derivar del dominio N-terminal o C-terminal de PD-1. En ciertas formas de realización de la invención, el inmunógeno es un fragmento de PD-1 que va desde los residuos de aminoácidos 25-170 de la SEC. ID. NO: 327 con un cambio C93S.

[0096] Los péptidos pueden ser modificados para incluir adición o sustitución de ciertos residuos para el etiquetado o para propósitos de conjugación a moléculas portadoras, tales como, KLH. Por ejemplo, una cisteína se puede agregar, ya sea en el extremo N-terminal o C-terminal de un péptido, o una secuencia ligadora se puede agregar para preparar el péptido para la conjugación con, por ejemplo, KLH para la inmunización.

[0097] La secuencia de aminoácidos de longitud completa de PD-1 humano de longitud completa se muestra como la SEC. ID. NO: 327.

[0098] En ciertas formas de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 se pueden preparar utilizando fragmentos de las regiones mencionadas anteriormente, o péptidos que se extienden más allá de las regiones designadas por aproximadamente 5 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de cualquiera de, o ambos, los extremos N o C terminales de las regiones descritas en el presente documento. En ciertas formas de realización, cualquier combinación de las regiones mencionadas anteriormente o sus fragmentos se pueden utilizar en la preparación de anticuerpos específicos PD-1. En ciertas formas de realización, una o más de las regiones mencionadas anteriormente de PD-1, o sus fragmentos se pueden utilizar para la preparación de anticuerpos monoespecíficos, bispecíficos, o multiespecíficos.

[0099] Ciertos anticuerpos anti-PD-1 de la presente invención son capaces de unirse a y neutralizar la actividad de PD-1, según lo determinado por ensayos in vitro o in vivo. La capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse a y neutralizar la actividad de PD-1 se puede medir utilizando cualquier método estándar conocido por los expertos en la técnica, incluyendo ensayos de unión o ensayos de actividad, tal como se describe en el presente documento.

[00100] Ejemplos de ensayos in vitro (no limitativos) para medir la actividad de unión se ilustran en los ejemplos en el presente documento. En el Ejemplo 3, las afinidades de unión y las constantes cinéticas de anticuerpos anti-PD-1 humano para PD-1 humano y PD-1 de cynomolgus se determinaron por resonancia de plasmón de superficie y las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore 4000 o T200. En los Ejemplos 4 y 5, se utilizaron ensayos de bloqueo para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 para bloquear la capacidad de unión de PD-L1 de PD-1 in vitro. En el Ejemplo 6, se utilizaron ensayos de bloqueo para determinar competencia cruzada entre anticuerpos anti-PD-1. El Ejemplo 7 describe la unión de los anticuerpos a células que sobreexpresan PD-1. En el Ejemplo 8, se utilizó un ensayo de luciferasa para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 para antagonizar la señalización de PD-1/PD-L1 en las células T.

[00101] En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención son capaces de mejorar o estimular la activación de células T in vitro y en un sujeto con cáncer o en un sujeto infectado con un virus tal como LCMV. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención se usan en combinación con un segundo agente

terapéutico, tal como un anticuerpo para un segundo co-inhibidor de células T, para mejorar la respuesta inmune e inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto.

[00102] Puede que los anticuerpos específicos para PD-1 no contengan etiquetas o restos adicionales o puede que contengan una etiqueta o resto N-terminal o C-terminal. En una forma de realización, la etiqueta o resto es biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de una etiqueta (si existe) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie sobre la que está unido el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina N-terminal se orientará de tal manera que la porción C-terminal del péptido será distal a la superficie. En una forma de realización, la etiqueta puede ser un radionúclido, un colorante fluorescente o una etiqueta detectable por MRI. En ciertas formas de realización, tales anticuerpos marcados pueden usarse en ensayos de diagnóstico que incluyen ensayos de formación de imágenes.

Fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos

[00103] A menos que se indique específicamente lo contrario, el término “anticuerpo”, tal como se utiliza en el presente documento, se entenderá que abarca moléculas de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (es decir, “moléculas completas de anticuerpos”), así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los términos “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo, y similares, tal como se utilizan en el presente documento, incluyen cualquier glicoproteína o polipéptido de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los términos “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo o “fragmento de anticuerpo”, tal como se utiliza en el presente documento, se refieren a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a PD-1. Un fragmento de anticuerpo puede incluir un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv, un fragmento dAb, un fragmento que contiene una CDR o una CDR aislada. En ciertas formas de realización, el término “fragmento de unión a antígeno” se refiere a un fragmento de polipéptido de una molécula de unión a antígeno multi-específica. En tales formas de realización, el término “fragmento de unión a antígeno” incluye, por ejemplo, un dominio extracelular de PD-1 que se une específicamente a PD-1. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas completas de anticuerpos utilizando cualquiera de las técnicas estándar adecuadas, tales como la digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables y (opcionalmente) constantes de anticuerpo. Tal ADN se conoce y/o se encuentra fácilmente disponible a partir de, por ejemplo, fuentes comerciales, genotecas de ADN (que incluye, por ejemplo, genotecas de fagos-anticuerpos), o se pueden sintetizar. El ADN se puede secuenciar y manipular químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

[00104] Ejemplos no limitativos de fragmentos de unión a antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv); (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de

reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad aislada (CDR) tal como un péptido CDR3) o un péptido FR3-CDR3-FR4 constreñido. Otras moléculas de ingeniería, tales como anticuerpos específicos de dominio, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio-eliminado, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados de CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIPs) y dominios de IgNAR variables de tiburón, también están abarcados dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno,” tal como se utiliza en el presente documento.

[00105] Un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y comprenderá generalmente al menos una CDR, que es adyacente a o en el marco con una o más secuencias de marco. En fragmentos de unión a antígeno que tienen un dominio V_H asociado con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados uno con relación a otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ o $V_L - V_L$. De manera alternativa, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

[00106] En ciertas formas de realización, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Ejemplos no limitativos de configuraciones de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) $V_H - C_H1$; (ii) $V_H - C_H2$; OÍD $V_H - C_H3$; (iv) $V_H - C_H1 - C_H2$; (v) $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (vi) $V_H - C_H2 - C_H3$; (vii) $V_H - C_L$; $V_L - C_H1$; (ix) $V_L - C_H2$; (x) $V_L - C_H3$; (xi) $V_L - C_H1 - C_H2$; (xii) $V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (xiii) $V_L - C_H2 - C_H3$; y (xiv) $V_L - C_L$. En cualquier configuración de los dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de los ejemplos de configuraciones que figuran anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar ya sea directamente unidos entre sí o pueden estar unidos por una región de bisagra completa o parcial o ligador. Una región bisagra puede consistir de al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, que resultan en una unión flexible o semi-flexible entre la variable adyacente y/o dominios constantes en una sola molécula de polipéptido. Por otra parte, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homo-dímero o hetero-dímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variable y constante que figuran anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios de V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante enlaces de disulfuro).

[00107] Al igual que con moléculas completas de anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno pueden ser mono-específicos o multi-específicos (por ejemplo, bi-específicos). Un fragmento de unión a antígeno multi-específico de un anticuerpo comprenderá normalmente al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpo multi-específico, incluyendo los ejemplos de formatos de anticuerpos bi-específicos descritos en el presente documento, se pueden adaptar para su uso en el contexto de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente invención utilizando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

Preparación de anticuerpos humanos

[00108] Los métodos para generar anticuerpos humanos en ratones transgénicos se conocen en la técnica. Cualquiera de dichos métodos conocidos se puede utilizar en el contexto de la presente invención para producir anticuerpos humanos que se unen específicamente a PD-1.

[00109] Un inmunógeno que comprende uno cualquiera de los siguientes puede utilizarse para generar anticuerpos para PD-1. En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención se obtienen a partir de ratones inmunizados con PD-1 nativo de longitud completa (véase número de acceso GenBank NP_005009.2) (SEC. ID. NO: 327), o con un péptido de PD-1 recombinante. De manera alternativa, la PD-1 o un fragmento de la misma se puede producir utilizando técnicas bioquímicas estándar y modificadas (SEO ID. NOS: 321-324) y se utiliza como inmunógeno.

[00110] En ciertas formas de realización, el inmunógeno puede ser un péptido del extremo N terminal o C terminal del PD-1. En una forma de realización, el inmunógeno es el dominio extracelular o el dominio tipo IgV de PD-1. En ciertas formas de realización de la invención, el inmunógeno es un fragmento de PD-1 que se encuentra en el rango desde aproximadamente los residuos de aminoácidos 25-170 de la SEC. ID. NO: 327 con un cambio C93S.

[00111] En algunas formas de realización, el inmunógeno puede ser un péptido de PD-1 recombinante expresado en *E. coli* o en cualquiera de las células eucariotas o de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO).

[00112] En ciertas formas de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a PD-1 se pueden preparar utilizando fragmentos de las regiones mencionadas anteriormente, o péptidos que se extienden más allá de las regiones designadas por aproximadamente 5 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de cualquiera de los dos, o ambos, de los extremos N o C terminal de las regiones descritas en el presente documento. En ciertas formas de realización, cualquier combinación de las regiones o fragmentos indicados anteriormente de los mismos se puede utilizar en la preparación de anticuerpos específicos de PD-1.

[00113] Utilizando la tecnología de VELOCIMMUNE® (véase, por ejemplo, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para generar anticuerpos monoclonales, los anticuerpos quiméricos de elevada afinidad a PD-1 se aíslan inicialmente teniendo una región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología de VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humanas unidas operativamente a un loci de región constante de ratón endógeno de tal manera que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a una estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se aíslan y unen de modo operativo al ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas. El ADN se expresa entonces en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

Bioequivalentes

[00114] Los anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de anticuerpo de la presente invención abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos, pero que conservan la capacidad de unirse a PD-1. Tales variantes de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia parental, pero exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Del mismo modo, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo de la presente invención abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia descrita, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

[00115] Dos proteínas de unión a antígenos o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administra en la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya seas dosis únicas o dosis múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en la medida de su absorción pero no en su tasa de absorción y, sin embargo, pueden ser considerados bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en la marca, no son esenciales para la obtención de concentraciones efectivas de fármacos en el cuerpo, por ejemplo, el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacéutico específico estudiado.

[00116] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en la seguridad, pureza o potencia.

[00117] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si un paciente puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un esperado incremento en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad o eficacia disminuida, en comparación con la terapia continuada sin tal cambio.

[00118] En una forma de realización, dos proteínas de unión a antígeno son bioequivalentes si ambas actúan por un mecanismo común o mecanismos de acción para la condición o condiciones de uso, en la medida en que tales mecanismos sean conocidos.

[00119] La bioequivalencia se puede demostrar por métodos in vivo y/o in vitro. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba in vivo en seres humanos u otros mamíferos, en donde la concentración del anticuerpo o de sus metabolitos se mide en la sangre, plasma, suero u otro fluido biológico como una función del tiempo; (b) una prueba in vitro que se ha correlacionado con y es razonablemente predictivo de los datos de biodisponibilidad humanos in vivo; (c) una prueba in vivo en seres humanos u otros mamíferos en los que el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su objetivo) se mide como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

[00120] Las variantes bioequivalentes de los anticuerpos de la invención se pueden construir mediante, por ejemplo, el uso de diversas sustituciones de residuos o secuencias o eliminando secuencias o residuos terminales o internos innecesarios para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica se pueden eliminar o reemplazar con otros aminoácidos para evitar la formación

de puentes de disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos, que modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o remueven glicosilación.

Anticuerpos anti-PD-1 que comprenden variantes de Fc

[00121] De acuerdo con ciertas formas de realización de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-PD-1 que comprenden un dominio de Fc que comprende una o más mutaciones que aumentan o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido, en comparación con pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 que comprenden una mutación en la región C_H2 o C_H3 del dominio Fc, en donde la o las mutaciones aumentan la afinidad del dominio Fc a FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en una endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Tales mutaciones pueden dar lugar a un aumento de la vida media en suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Ejemplos no limitativos de tales modificaciones de Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q); 250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L/Y/F/W o T), 254 (por ejemplo, S o T) y 256 (por ejemplo, S/R/Q/E/D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H/L/R/S/P/Q o K) y/o 434 (por ejemplo, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F) y 434. En una forma de realización, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una 428L, 2591 (por ejemplo, V2591) y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254 y 256 (por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P). En aún otra forma de realización, la modificación comprende una modificación 265A (por ejemplo, D265A) y/o una 297A (por ejemplo, N297A).

[00122] Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo constituido por: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); 2571 y 3111 (por ejemplo, P2571 y Q3111); 2571 y 434H (por ejemplo, P2571 y N434H); 376V y 434H (por ejemplo, D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (por ejemplo, T307A, E380A y N434A); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). En una forma de realización, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 que comprenden un dominio Fc que comprende una mutación S108P en la región bisagra de IgG4 para promover la estabilización del dímero. Todas las posibles combinaciones de las mutaciones del dominio Fc que anteceden y otras mutaciones dentro de los dominios variables de anticuerpos descritos en el presente documento, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

[00123] La presente invención también incluye anticuerpos anti-PD-1 que comprenden una región constante de cadena pesada quimérica (C_H), en donde la región quimérica C_H comprende segmentos derivados de las regiones C_H de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden comprender una

región quimérica C_H que comprende parte o la totalidad de un dominio C_{H2} derivado de una molécula IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana, combinada con parte o la totalidad de un dominio de C_{H3} derivado de una molécula IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana. De acuerdo con ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención comprenden una región quimérica C_H que tiene una región de bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de aminoácidos de “bisagra superior” (residuos de aminoácidos desde las posiciones 216 a 227 según la numeración de EU) derivada de una región bisagra de una IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana, combinada con una secuencia de “bisagra inferior” (residuos de aminoácidos desde las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración de EU) derivada de una región bisagra de una IgG1 humana, una IgG2 humana o una IgG4 humana. De acuerdo con ciertas formas de realización, la región bisagra quimérica comprende residuos de aminoácidos derivados de una bisagra superior de IgG1 humana o una IgG4 humana y residuos de aminoácidos derivados de una bisagra inferior de IgG2 humana. Un anticuerpo que comprende una región quimérica C_H tal como se describe en el presente documento puede, en ciertas formas de realización, exhibir funciones efectoras de Fc modificadas sin afectar negativamente las propiedades terapéuticas o farmacocinéticas del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, USSN. 14/170.166, que se presentó el 31 de enero de 2014, cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad).

Características biológicas de los anticuerpos

[00124] En general, los anticuerpos de la presente invención funcionan mediante la unión a PD-1. La presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a moléculas de PD-1 monoméricas o dimericas solubles con alta afinidad. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos que se unen a PD-1 monomérico (por ejemplo, a 25°C o a 37°C) con una K_D de menos de aproximadamente 50 nM tal como se mide por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, utilizando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento. En ciertas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos unen PD-1 monomérico con una K_D de menos de aproximadamente 40 nM, menos de aproximadamente 30 nM, menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 10 nM menos de aproximadamente 5 nM, menos de aproximadamente 2 nM o menos de aproximadamente 1 nM, según se mide por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, utilizando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[00125] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que unen PD-1 dimerico (por ejemplo, a 25°C o a 37°C) con una K_D de menos de aproximadamente 400 pM según se mide por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, utilizando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento. En ciertas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos unen PD-1 dimerico con una K_D de menos de aproximadamente 300 pM, menos de aproximadamente 250 pM, menos de aproximadamente 200 pM, menos de aproximadamente 100 pM o menos de aproximadamente 50 pM, según se mide por resonancia de plasmón de superficie, por

ejemplo, utilizando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[00126] La presente invención también incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que unen PD-1 de cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (por ejemplo, a 25°C a 37°C) con una K_D de menos de aproximadamente 35 nM tal como se mide por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, utilizando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento. En ciertas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos unen PD-1 de cynomolgus con una K_D de menos de aproximadamente 30 nM, menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 15 nM, menos de aproximadamente 10 nM, o menos de aproximadamente 5 nM, según se mide por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, utilizando el formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[00127] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que unen PD-1 con una vida media disociativa ($t_{1/2}$) de más de aproximadamente 1,1 minutos tal como se mide por resonancia de plasmón de superficie a 25°C o 37°C, por ejemplo, utilizando una formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas formas de realización, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención unen PD-1 con un $t_{1/2}$ de más de aproximadamente 5 minutos, más de aproximadamente 10 minutos, más de aproximadamente 30 minutos, más de aproximadamente 50 minutos, más de aproximadamente 60 minutos, más de aproximadamente 70 minutos, más de aproximadamente 80 minutos, más de aproximadamente 90 minutos, más de aproximadamente 100 minutos, más de aproximadamente 200 minutos, más de aproximadamente 300 minutos, más de aproximadamente 400 minutos, más de aproximadamente 500 minutos, más de aproximadamente 600 minutos, más de aproximadamente 700 minutos, más de aproximadamente 800 minutos, más de aproximadamente 900 minutos, más de aproximadamente 1000 minutos o más de aproximadamente 1200 minutos, según se mide por resonancia de plasmón de superficie a 25°C o 37°C, por ejemplo, utilizando un formato de ensayo tal como se define en el Ejemplo 3 en el presente documento (por ejemplo, formato de captura de antígeno o captura de mAb), o un ensayo sustancialmente similar.

[00128] La presente invención también incluye anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que bloquean la unión de PD-1 a PD-L1 con una IC_{50} de menos de aproximadamente 3 nM tal como se determina utilizando un ensayo de inmunoensayo basado en ELISA, por ejemplo, tal como se muestra en el Ejemplo 4, o un ensayo sustancialmente similar. La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a PD-1 y mejoran la unión de PD-1 a PD-L1.

[00129] En algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse al dominio extracelular de PD-1 o a un fragmento del dominio. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a más de un dominio (anticuerpos de reactividad cruzada). En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a un epítipo localizado en el dominio extracelular comprende residuos de aminoácidos 21-171 de PD-1 (SEC. ID. NO: 327). En una forma de realización, los anticuerpos se pueden unir a un epítipo que comprende uno o

más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de residuos de aminoácidos 1-146 de la SEC. ID. NOs: 321-324.

[00130] En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden funcionar mediante el bloqueo o la inhibición de la actividad de unión de PD-L1 asociada con PD-1 mediante la unión a cualquier otra región o fragmento de la proteína de longitud completa, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC. ID. NO: 327. En ciertas formas de realización, los anticuerpos pueden atenuar o modular la interacción entre PD-1 y PD-L1.

[00131] En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos bi-específicos. Los anticuerpos bi-específicos de la invención pueden unir un epítipo en un dominio y también pueden unir un segundo epítipo en un dominio diferente de PD-1. En ciertas formas de realización, los anticuerpos bi-específicos de la invención pueden unir dos epítopos diferentes en el mismo dominio. En una forma de realización, la molécula de unión a antígeno multi-específica comprende una primera especificidad de unión en donde la primera especificidad de unión comprende el dominio extracelular o fragmento del mismo de PD-L1; y una segunda especificidad de unión a otro epítipo de PD-1.

[00132] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a PD-1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo exhibe una o más de las siguientes características: (i) comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 210, 218, 226, 234, 242, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306 y 314 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186 y 202 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) comprende un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 216, 224, 232, 240, 248, 256, 264, 272, 280, 288, 296, 304, 312 y 320 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192 y 208 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) comprende un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 212, 220, 228, 236, 244, 252, 260, 268, 276, 284, 292, 300, 308 y 316 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 214, 222, 230, 238, 246, 254, 262, 270, 278, 286, 294, 302, 310 y 318 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188 y 204 o su secuencia sustancialmente similar

que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190 y 206 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) es una molécula de unión a antígeno multi-específica que comprende una primera especificidad de unión a PD-1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en PD-1, un antígeno específico de tumor, un antígeno específico de tejido autoinmune, un antígeno de células infectadas viralmente, un co-inhibidor de célula T diferente, receptor de células T y un receptor de Fc; (vi) se une a PD-1 humano con una K_D de aproximadamente 28 pM a aproximadamente 1,5 pM; (vii) se une a PD-1 de cynomolgus con una K_D de aproximadamente 3 nM hasta aproximadamente 7,5 pM; (viii) bloquea o potencia la unión de PD-1 a PD-L1 con un IC_{50} de aproximadamente 3,3 nM; (ix) bloquea la regulación por disminución de las células T inducida por PD-1 y/o rescata la señalización de células T en un ensayo reportero de luciferasa APC/células T; (x) estimula la proliferación de células T y la actividad en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR); (xi) induce la producción de IL-2 y/o IFN γ en un ensayo de MLR; y (xii) suprime el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en pacientes con cáncer.

[00133] En una forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo presenta una o más de las siguientes características: (i) comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 130, 162, 234 y 314 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 138, 170, 186 y 202 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) comprende un dominio HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 136, 168, 240 y 320 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 144, 176, 192 y 208 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) comprende un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 132, 164, 236 y 316 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 134, 166, 238 y 318 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 140, 172, 188 y 204 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y un dominio de LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC. ID. NO: 142, 174, 190 y 206 o su secuencia sustancialmente similar que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) es una molécula de unión a

antígeno multi-específica que comprende una primera especificidad de unión de PD-1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un epítipo diferente de PD-1, un antígeno específico de tumor, un antígeno específico de tejido autoinmune, un antígeno de células infectadas viralmente, un co-inhibidor de célula T diferente, receptor de células T y un receptor de Fc; (vi) se une a PD-1 humano con una $K_D = 10^{-9}M$; (vii) se une a PD-1 de cynomolgus con una $K_D = 10^{-8}M$; (viii) bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 con un $IC_{50} 10^{-10}M$; (ix) bloquea la regulación por disminución de las células T inducida por PD-1 y/o rescata la señalización de células T en un ensayo reportero de luciferasa APC/células T; (x) estimula la proliferación de células T y la actividad en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR); (xi) induce la producción de IL-2 y/o IFN γ en un ensayo de MLR; y (xii) suprime el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en pacientes con cáncer.

[00134] Los anticuerpos de la presente invención pueden poseer una o más de las características biológicas antes mencionadas o cualquier combinación de las mismas. Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para un persona normalmente versada en la técnica a partir de una revisión de la presente descripción, incluyendo los ejemplos de trabajo en el presente documento.

Selectividad de especies y reactividad cruzada de especies

[00135] De acuerdo con ciertas formas de realización de la invención, los anticuerpos anti-PD-1 se unen a PD-1 humano pero no a PD-1 de otras especies. De manera alternativa, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención, en ciertas formas de realización, se unen a PD-1 humano y PD-1 a partir de una o más especies no humanas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención pueden unirse a PD-1 humano y pueden unirse o no, según sea el caso, a uno o más de PD-1 de ratón, rata, conejillo de indias, hámster, jerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, cynomolgus, tití, rhesus o chimpancé. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención pueden unirse a PD-1 humano y de cynomolgus con las mismas afinidades o con diferentes afinidades, pero no se unen a PD-1 de rata y ratón.

Mapeo de epítopos y tecnologías relacionadas

[00136] La presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 que interactúan con uno o más aminoácidos que se encuentran dentro de uno o más dominios de la molécula de PD-1 que incluyen, por ejemplo, un dominio extracelular (tipo IgV), un dominio transmembrana y un dominio intracelular que contiene el motivo de inhibición inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y motivo de cambio inmunoreceptor basado en tirosina (ITSM). El epítipo al que se unen los anticuerpos puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos localizados dentro de cualquiera de los dominios mencionados anteriormente de la molécula de PD-L1 (por ejemplo, un epítipo lineal en un dominio). De manera alternativa, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) situados dentro de uno o ambos de los dominios mencionados anteriormente de la molécula de PD-L1 (por ejemplo, un epítipo conformacional).

[00137] Varias técnicas conocidas por los expertos en la técnica se pueden utilizar para determinar si un anticuerpo “interactúa con uno o más aminoácidos” dentro de un

polipéptido o proteína. Ejemplos de técnicas incluyen, por ejemplo, ensayos de bloqueo cruzado de rutina, tal como se describe en *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Otros métodos incluyen análisis mutacional de exploración de alanina, análisis de transferencia de péptido (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), estudios cristalográficos de análisis de escisión de péptido y análisis de RMN. Además, se pueden emplear métodos tales como escisión de epítipo, extracción de epítipo y modificación química de antígenos (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Otro método que se puede utilizar para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que un anticuerpo interactúa es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica el marcado de deuterio de la proteína de interés, seguido por la unión del anticuerpo a la proteína marcada con deuterio. Luego, el complejo de proteína/anticuerpo se transfiere al agua y protones intercambiables dentro de los aminoácidos que están protegidos por el complejo de anticuerpo que se somete al retro-intercambio de deuterio a hidrógeno a un ritmo más lento que los protones intercambiables dentro de los aminoácidos que no son parte de la interfaz. Como resultado, los aminoácidos que forman parte de la interfaz de proteína/anticuerpo pueden retener deuterio y por lo tanto exhiben masa relativamente mayor en comparación con los aminoácidos no incluidos en la interfaz. Luego de la disociación del anticuerpo, la proteína objetivo se somete a la escisión por proteasas y análisis de espectrometría de masas, revelando de ese modo los residuos marcados con deuterio que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[00138] El término “epítipo” se refiere a un sitio en un antígeno al que las células B y/o T responden. Los epítipos de células B se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se retienen en la exposición a solventes desnaturalizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con solventes desnaturalizantes. Un epítipo incluye normalmente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

[00139] Perfil de Modificación Asistida (MAP), también conocido como Perfil de Anticuerpo basado en la Estructura del antígeno (ASAP), es un método que clasifica un gran número de anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo con las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo para modificar química o enzimáticamente las superficies del antígeno (véase el documento US 2004/0101920, que se incorpora específicamente en el presente documento como referencia en su totalidad). Cada categoría puede reflejar un epítipo único que sea claramente diferente o que se superpone parcialmente con el epítipo representado por otra categoría. Esta tecnología permite una rápida filtración de anticuerpos genéticamente idénticos, de manera tal que la caracterización se puede centrar en anticuerpos genéticamente distintos. Cuando se aplica al rastreo de hibridomas, MAP puede facilitar la identificación de clones raros de hibridoma que producen mAbs que tienen las características deseadas. MAP se puede utilizar para clasificar los anticuerpos de la invención en grupos de anticuerpos que se unen a diferentes epítipos.

[00140] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos unen un epítope dentro de una cualquiera o más de las

regiones ejemplificadas en PD-1, ya sea en forma natural, tal como se ejemplifica en la SEC ID NO: 327, o producidos de modo recombinante, tal como se ejemplifica en la SEC. ID. NOS: 321-324, o a un fragmento de las mismas. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se unen a una región extracelular que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de residuos de aminoácidos 21-171 de PD-1. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se unen a una región extracelular que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos 1-146 de PD-1 de cynomolgus, tal como se ejemplifica por la SEC. ID. NO: 322.

[00141] En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención, tal como se muestran en la Tabla 1, interactúan con al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de residuos de aminoácidos que van desde aproximadamente la posición 21 a aproximadamente la posición 136 de la SEC. ID. NO: 327; o residuos de aminoácidos que van desde aproximadamente la posición 136 hasta aproximadamente la posición 171 de la SEC. ID. NO: 327. Estas regiones se ejemplifican parcialmente en SEC. ID. NOs: 321-324.

[00142] La presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 que se unen al mismo epítipo, o a una porción del epítipo, como cualquiera de los ejemplos de anticuerpos específicos descritos en el presente documento en la Tabla 1, o a un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de los ejemplos de anticuerpos descritos en la Tabla 1. Asimismo, la presente invención también incluye anticuerpos anti-PD-1 que compiten por la unión a PD-1 o un fragmento de PD-1 con cualquiera de los ejemplos de anticuerpos específicos descritos en el presente documento en la Tabla 1, o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de los ejemplos de anticuerpos descritos en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-1 que compiten en forma cruzada por la unión a PD-1 con uno o más anticuerpos tal como se define en el Ejemplo 6 en el presente documento (por ejemplo, H2aM7788N, H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P y H2aM7795N).

[00143] Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo o compite por la unión con un anticuerpo anti-PD-1 de referencia mediante el uso de métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo como un anticuerpo anti-PD-1 de referencia de la invención, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína PD-1 o péptido bajo condiciones de saturación. Luego, la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la molécula de PD-1 se evalúa. Si el anticuerpo de prueba es capaz de unirse a PD-1 después de la unión de saturación con el anticuerpo anti-PD-1 de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de prueba se une a un epítipo diferente que el anticuerpo anti-PD-1 de referencia. Por otro lado, si el anticuerpo de prueba no es capaz de unirse a la proteína PD-1 después de la unión de saturación con el anticuerpo anti-PD-1 de referencia, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo tal como el epítipo unido por el anticuerpo anti-PD-1 de referencia de la invención.

[00144] Para determinar si un anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo anti-PD-1 de referencia, la metodología de unión anteriormente descrita se lleva a cabo en dos orientaciones: en una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína de PD-1 bajo condiciones de saturación, seguido por la evaluación de la

unión del anticuerpo de prueba a la molécula de PD-1. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de PD-1 bajo condiciones de saturación, seguido por la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de PD-1. Si, en ambas orientaciones, sólo el primer anticuerpo (saturación) es capaz de unirse a la molécula de PD-1, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten para la unión a PD-1. Tal como se apreciará por una persona normalmente versada en la técnica, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia no necesariamente se une al epítipo idéntico como el anticuerpo de referencia, pero pueden bloquear estéricamente la unión del anticuerpo de referencia por la unión de un epítipo superpuesto o adyacente.

[00145] Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o al epítipo superpuesto si cada uno inhibe competitivamente (bloquea) la unión del otro a antígeno. Es decir, un exceso de un anticuerpo de 1, 5, 10, 20 o 100 veces inhibe la unión del otro por al menos 50%, pero preferentemente 75%, 90% o incluso 99% tal como se mide en un ensayo de competición de unión (véase, por ejemplo, Junghans et al., Cancer Res. 1990 50: 1495-1502). De manera alternativa, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítopos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo reducen o eliminan la unión del otro.

[00146] La experimentación de rutina adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) se puede llevar a cabo entonces para confirmar si la falta observada de unión del anticuerpo de prueba es, de hecho, debido a la unión al mismo epítipo como el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de esta clasificación se pueden realizar utilizando ELISA, RIA, resonancia de plasmón de superficie, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión de anticuerpos cuantitativo o cualitativo disponible en la técnica.

Inmunoconjugados

[00147] La invención abarca un anticuerpo monoclonal humano anti-PD-1 conjugado con un resto terapéutico (“inmunoconjugado”), tal como una citotoxina o un agente quimioterapéutico para tratar el cáncer. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “inmunoconjugado” se refiere a un anticuerpo que se encuentra química o biológicamente unido a una citotoxina, un agente radioactivo, una citocina, un interferón, un resto objetivo o reportero, una enzima, una toxina, un péptido o proteína o un agente terapéutico. El anticuerpo se puede unir a la citotoxina, agente radiactivo, citocina, interferón, resto objetivo o reportero, enzima, toxina, péptido o agente terapéutico en cualquier localización a lo largo de la molécula de modo que es capaz de unirse a su objetivo. Ejemplos de inmunoconjugados incluyen conjugados de fármacos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpo-toxina. En una forma de realización, el agente puede ser un segundo anticuerpo diferente a PD-1. En ciertas formas de realización, el anticuerpo se puede conjugar a un agente específico para una célula tumoral o una célula infectada viralmente. El tipo de resto terapéutico que se puede conjugar con el anticuerpo anti—PD-1 y tendrá en cuenta la afección a tratarse y el efecto terapéutico deseado a alcanzar.

Ejemplos de agentes adecuados para la formación de inmunoconjugados se conocen en la técnica; véase, por ejemplo, el documento WO 05/103081.

Anticuerpos multi-específicos

[00148] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser mono-específicos, bi-específicos o multi-específicos. Los anticuerpos multi-específicos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido objetivo o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido objetivo. Véase, por ejemplo, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244.

[00149] En un aspecto, la presente invención incluye moléculas de unión a antígeno multi-específicas o fragmentos de unión a antígeno de las mismas en donde una especificidad de una inmunoglobulina es específica para el dominio extracelular de PD-1, o un fragmento del mismo, y la otra especificidad de la inmunoglobulina es específica para la unión fuera del dominio extracelular de PD-1, o un segundo objetivo terapéutico, o se conjuga con un resto terapéutico. En ciertas formas de realización, la primera especificidad de unión a antígeno puede comprender PD-L1 o PD-L2, o su fragmento. En ciertas formas de realización de la invención, una especificidad de una inmunoglobulina es específica para un epítipo que comprende residuos de aminoácidos 21- 171 de PD-1 (SEC. ID. NO: 327) o un fragmento del mismo, y la otra especificidad de la inmunoglobulina es específica para un segundo antígeno objetivo. El segundo antígeno objetivo puede estar en la misma célula que PD-1 o en una célula diferente. En una forma de realización, la segunda célula objetivo está en una célula inmune distinta de una célula T tal como una célula B, célula presentadora de antígenos, monocitos, macrófagos o células dendríticas. En algunas formas de realización, el segundo antígeno objetivo puede estar presente en una célula tumoral o una célula de tejido autoinmune o en una célula infectada viralmente.

[00150] En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de unión a antígeno multi-específicas o fragmentos de unión a antígeno de las mismas que comprenden una primera especificidad de unión a antígeno que se une a PD-1 y una segunda especificidad de unión a antígeno que se une a un receptor de células T, un receptor de células B o un receptor de Fc. En un aspecto relacionado, la invención proporciona moléculas de unión a antígeno multi-específicas o fragmentos de unión a antígeno de las mismas que comprenden una primera especificidad de unión a antígeno que se une a PD-1 y una segunda especificidad de unión a antígeno que se une a un co-inhibidor de células T diferente tal como LAG-3, CTLA-4, BTLA, CD-28, 2B4, LY108, TIGIT, TIM3, LAIR1, ICOS y CD160.

[00151] En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de unión a antígeno multi-específicas o fragmentos de unión a antígeno de las mismas que comprenden una primera especificidad de unión a antígeno que se une a PD-1 y una segunda especificidad de unión a antígeno que se une a un antígeno específico de tejido autoinmune. En ciertas formas de realización, los anticuerpos pueden ser anticuerpos agonistas o de activación.

[00152] Cualquiera de las moléculas de unión a antígeno multi-específicas de la invención, o variantes de las mismas, pueden construirse utilizando técnicas de biología molecular estándar (por ejemplo, tecnología de expresión de proteínas y ADN recombinante), tal como es conocido por una persona normalmente versada en la técnica.

[00153] En algunas formas de realización, los anticuerpos específicos de PD-1 se generan en un formato bi-específico (un “bi-específico”) en el que las regiones variables unidas a dominios distintos de PD-1 se unen entre sí para conferir especificidad de doble

dominio dentro de una sola molécula de unión. Los bi-específicos adecuadamente diseñados pueden mejorar la eficacia global inhibitoria de PD-1 aumentando tanto la especificidad como avidéz de unión. Las regiones variables con especificidad para los dominios individuales, (por ejemplo, segmentos del dominio N-terminal), o que pueden unirse a diferentes regiones dentro de un dominio, están emparejadas en un andamio estructural que permite que cada región se una simultáneamente a los epítomos separados, o a diferentes regiones dentro de un dominio. En un ejemplo de un bi-específico, las regiones variables de cadena pesada (V_H) de un aglutinante con especificidad para un dominio se recombinan con las regiones variables de cadena ligera (V_L) de una serie de aglutinantes con especificidad para un segundo dominio para identificar compañero no relacionado V_L que se pueden combinar con una V_H original sin alterar la especificidad original para aquella V_H . De esta manera, un solo segmento V_L (por ejemplo, V_{L1}) se puede combinar con dos dominios V_H diferentes (por ejemplo, V_{H1} y V_{H2}) para generar un bi-específico compuesto de dos “brazos” de unión (V_{H1} - V_{L1} y V_{H2} - V_{L1}). El uso de un único segmento V_L reduce la complejidad del sistema y por lo tanto simplifica y aumenta la eficiencia en los procesos de clonación, expresión y purificación utilizados para generar el bi-específico (Véase, por ejemplo, USSN13/022759 y US2010/0331527).

[00154] De manera alternativa, los anticuerpos que unen más de un dominio y un segundo objetivo, tal como, pero sin limitarse a, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-PD-1 diferente, se puede preparar en un formato bi-específico utilizando las técnicas descritas en el presente documento u otras técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las regiones variables de anticuerpo de unión a regiones distintas se pueden unir entre sí con regiones variables que se unen a sitios relevantes en, por ejemplo, el dominio extracelular de PD-1, para conferir especificidad de antígeno dual dentro de una sola molécula de unión. Los bi-específicos diseñados apropiadamente de esta naturaleza tienen una función dual. Las regiones variables con especificidad para el dominio extracelular se emparejan con una región variable con especificidad por fuera del dominio extracelular y se combinan en un andamio estructural que permite que cada región variable se una a los antígenos separados.

[00155] Un ejemplo de formato de anticuerpo bi-específico que se puede utilizar en el contexto de la presente invención implica el uso de un primer dominio C_H3 de inmunoglobulina (Ig) y un segundo dominio C_H3 de Ig, en donde el primer y segundo dominio C_H3 de Ig difieren entre sí por al menos un aminoácido, y en donde al menos una diferencia de aminoácidos reduce la unión del anticuerpo bi-específico a la proteína A en comparación con un anticuerpo bi-específico que carece de la diferencia de aminoácido. En una forma de realización, el primer dominio C_H3 de Ig se une a la proteína A y el segundo dominio C_H3 de Ig contiene una mutación que reduce o suprime la unión de la proteína A tal como una modificación H95R (por numeración IMGT exón; H435R por numeración de EU). La segunda C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por EU). Otras modificaciones que se pueden encontrar dentro de la segunda C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por EU) en el caso de anticuerpo de IgG1; N44S, K52N y V82I (IMGT; N384S, K392N y V422I por EU) en el caso de anticuerpo de IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q y V422I por EU) en el caso de anticuerpos de IgG4. Las variaciones sobre el formato del anticuerpo bi-específico que se han descrito anteriormente se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

[00156] Otros ejemplos de formatos bi-específicos que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos bi-específicos de diacuerpo o a base de scFv, fusiones de IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, cuadroma, botón en ojal, cadena ligera común (por ejemplo, cadena ligera común con botón en ojal, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED)cuerpo, cremallera de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de acción dual (DAF)-IgG y formatos bi-específicos Mab² (véase, por ejemplo, Klein et al. 2012, mAbs 4: 6,1-11 y referencias citadas en la misma, para una revisión de los formatos anteriores). Los anticuerpos bi-específicos también se pueden construir utilizando conjugación de péptido/ácido nucleico, por ejemplo, en donde los aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal se utilizan para generar conjugados anticuerpo-oligonucleótido específicos del sitio que luego se auto-ensamblan en complejos multinuméricos con composición definida, la valencia y la geometría. (Véase, por ejemplo, Kazane et al., J. Am. Chem. Soc. [Epub: Dec. 4, 2012]).

Administración terapéutica y formulaciones

[00157] La invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-PD-1 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención se administrarán con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, suministro, tolerancia y similares. Una multitud de formulaciones adecuadas se pueden encontrar en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (aniónicos o catiónicos) (tales como de LIPOFECTINTM), conjugados de ADN, pastas de absorción de anhidro, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Véase también Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00158] La administración de la dosis de anticuerpo puede variar dependiendo de la edad y textura de un sujeto, la enfermedad objetivo, las condiciones, la vía de administración y similares. Cuando se utiliza un anticuerpo de la presente invención para tratar una enfermedad o trastorno en un paciente adulto, o para la prevención de una enfermedad tal, es ventajoso administrar el anticuerpo de la presente invención normalmente a una dosis única de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 o de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Se puede ajustar dependiendo de la severidad de la afección, la frecuencia y la duración del tratamiento. En ciertas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se pueden administrar como una dosis inicial de al menos aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg o de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 100 mg o de aproximadamente 50 mg. En ciertas formas de realización, la dosis inicial puede ser seguida por la administración de una segunda o una pluralidad de dosis posteriores del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en una cantidad

que puede ser aproximadamente la misma o menor que la de la dosis inicial, en donde las dosis posteriores están separadas por al menos 1 día a 3 días; al menos una semana, al menos 2 semanas; al menos 3 semanas; al menos 4 semanas; al menos 5 semanas; al menos 6 semanas; al menos 7 semanas; al menos 8 semanas; al menos 9 semanas; al menos 10 semanas; al menos 12 semanas; o al menos 14 semanas.

[00159] Varios sistemas de administración se conocen y se pueden utilizar para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vías intradérmicas, transdérmicas, intramusculares, intraperitoneales, intravenosas, subcutáneas, intranasales, epidurales y orales. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La composición farmacéutica puede también administrarse en una vesícula, en especial un liposoma (véase, por ejemplo, Langer (1990) *Science* 249: 1527-1533).

[00160] El uso de nanopartículas para suministrar los anticuerpos de la presente invención también se contempla en el presente documento. Las nanopartículas conjugadas a anticuerpo se pueden utilizar tanto para aplicaciones terapéuticas como de diagnóstico. Las nanopartículas conjugadas a anticuerpo y métodos de preparación y uso se describen en detalle por Arruebo, M., et al. 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389), que se incorpora en el presente documento como referencia. Las nanopartículas se pueden desarrollar y conjugar con anticuerpos contenidos en composiciones farmacéuticas para dirigir las células tumorales o células de tejido autoinmunes o células infectadas viralmente. Las nanopartículas para la administración de fármacos también se han descrito en, por ejemplo, US 8257740 o US 8246995, cada una incorporada en el presente documento en su totalidad.

[00161] En ciertas situaciones, la composición farmacéutica se puede suministrar en un sistema de liberación controlada. En una forma de realización, se puede utilizar una bomba. En otra forma de realización, se pueden utilizar materiales poliméricos. En incluso otra forma de realización, un sistema de liberación controlada se puede colocar en la proximidad del objetivo de la composición, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica.

[00162] Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para administración intravenosa, subcutánea, intracutánea, intracraneal, intraperitoneal e inyecciones intramusculares, infusiones de goteo, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar mediante métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal tal como se ha descrito anteriormente en un medio acuoso estéril o un medio oleoso usado convencionalmente para inyecciones. Como el medio acuoso para inyección, existe, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que se pueden utilizar en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un agente tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, aducto HCO-50 (polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino

hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplea, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que se puede utilizar en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera se llena de modo preferente en una ampolla apropiada.

[00163] Una composición farmacéutica de la presente invención se puede suministrar por vía subcutánea o por vía intravenosa con una aguja y una jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de suministro tipo pluma presenta aplicaciones con facilidad en el suministro de una composición farmacéutica de la presente invención. Tal dispositivo de suministro tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración tipo pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que la totalidad de la composición farmacéutica dentro del cartucho se ha administrado y el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede ser fácilmente desechado y sustituido por un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de suministro tipo pluma puede entonces ser reutilizado. En un dispositivo de administración tipo pluma desechable, no hay ningún cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de administración tipo pluma desechable viene relleno previamente con la composición farmacéutica almacenada en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, se desecha todo el dispositivo.

[00164] Numerosos dispositivos de administración autoinyectores y tipo pluma reutilizables tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero sin duda no se limitan a AUTOPENTM (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), DISETRONICTM pen (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suiza), HUMALOG MIX 75/25TM pen, HUMALOGTM pen, HUMALIN 70130TM pen (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPENTM I, II y III (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), NOVOPEN JUNIORTM (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca), BDTM pen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPENTM, OPTIPEN PROTM, OPTIPEN STARLETTM y OPTICLIKTM (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar sólo unos pocos. Ejemplos de dispositivos de administración tipo pluma desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero ciertamente no se limitan a la pluma SOLOSTARTM (Sanofi-Aventis), al FLEXPENTM (Novo Nordisk) y al KWIKPENTM (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICKTM (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLETTM (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.) y HUMIRATM Pen (Abbott Labs, Abbott Park, IL), por nombrar sólo unos pocos.

[00165] De manera ventajosa, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para adaptarse a una dosis de los ingredientes activos. Tales formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad del anticuerpo contenido es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por forma de dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas de dosificación.

Usos terapéuticos de los anticuerpos

[00166] Los anticuerpos de la invención son útiles, entre otras cosas, para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociados con o mediados por la expresión, señalización, o actividad de PD-1, o tratables mediante el bloqueo de la interacción entre PD-1 y el ligando PD-1 (por ejemplo, PD-L1 o PD-L2) o de otra manera la inhibición de la actividad y/o señalización de PD-1. Por ejemplo, la presente invención proporciona métodos para el tratamiento del cáncer (inhibición del crecimiento tumoral), infecciones virales crónicas y/o enfermedad autoinmune mediante la administración de un anticuerpo anti-PD-1 (o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-1) tal como se describe en el presente documento a un paciente en necesidad de tal tratamiento. Los anticuerpos de la presente invención son útiles para el tratamiento, prevención y/o mejora de la enfermedad o trastorno o afección tal como el cáncer, enfermedad autoinmune o una infección viral y/o para mejorar al menos un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección. En el contexto de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, el anticuerpo anti-PD-1 puede administrarse como una monoterapia (es decir, como el único agente terapéutico) o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales (ejemplos de los cuales se describen en otra parte en el presente documento).

[00167] En algunas formas de realización de la invención, los anticuerpos descritos en el presente documento son útiles para tratar sujetos que sufren de cáncer primario o recurrente, incluyendo, pero sin limitarse a, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma multiforme), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple y melanoma.

[00168] Los anticuerpos pueden ser utilizados para tratar los síntomas de etapa temprana o la fase tardía de cáncer. En una forma de realización, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención se puede utilizar para tratar el cáncer metastásico. Los anticuerpos son útiles en la reducción o la inhibición o la reducción de crecimiento tumoral de ambos tumores sólidos y cánceres de la sangre. En ciertas formas de realización, el tratamiento con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención conduce a más de 50% de regresión, más de 60% de regresión, más de 70% de regresión, más de 80% de regresión o más de 90% de regresión de un tumor en un sujeto. En ciertas formas de realización, los anticuerpos se pueden usar para prevenir la recaída de un tumor. En ciertas realizaciones, los anticuerpos son útiles en la extensión de la supervivencia global en un sujeto con cáncer. En algunas formas de realización, los anticuerpos son útiles en la reducción de la toxicidad debida a la quimioterapia o la radioterapia mientras se mantiene la supervivencia a largo plazo en un paciente que sufre de cáncer.

[00169] En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar sujetos que sufren de una infección viral crónica. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención son útiles en la disminución de los títulos virales en el huésped y/o el rescate de las células T agotadas. En ciertas formas de realización, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención se puede utilizar para tratar la infección viral crónica mediante el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se pueden administrar en una dosis terapéutica a un paciente con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus del papiloma humano (VPH) o virus de hepatitis B/C (VHB/VHC). En una forma de realización relacionada, un anticuerpo

o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se pueden usar para tratar una infección mediante el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) en un sujeto simios tal como cynomolgus.

[00170] En ciertas formas de realización, un anticuerpo de bloqueo de la presente invención se puede administrar en una cantidad terapéuticamente efectiva a un sujeto que padece un cáncer o una infección viral.

[00171] En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, incluyendo, pero sin limitarse a, alopecia areata, hepatitis autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain—Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, enfermedad inflamatoria intestinal, miopatías inflamatorias, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, vitiligo, pancreatitis autoinmune, urticaria autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes tipo I, fascitis eosinofílica, enterogastritis eosinofílica, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, artritis psoriásica, fiebre reumática, colitis ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener. En ciertas formas de realización, un anticuerpo activador de la invención se puede ser utilizar para tratar un sujeto que padece la enfermedad autoinmune.

[00172] Uno o más anticuerpos de la presente invención se pueden administrar para aliviar o prevenir o disminuir la gravedad de uno o más de los síntomas o condiciones de la enfermedad o trastorno.

[00173] También se contempla en el presente documento para usar uno o más anticuerpos de la presente invención profilácticamente a los pacientes en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno tales como cáncer, enfermedad autoinmune e infección viral crónica.

[00174] En una forma de realización adicional de la invención, los presentes anticuerpos se usan para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de pacientes que sufren de cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral. En otra forma de realización de la invención, los presentes anticuerpos se utilizan como complemento de la terapia con cualquier otro agente o cualquier otra terapia conocida por los expertos en la técnica útil para tratar el cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral.

Terapias de combinación y formulaciones

[00175] Las terapias de combinación pueden incluir un anticuerpo anti—PD-1 de la invención y cualquier agente terapéutico adicional que se puede combinar de manera ventajosa con un anticuerpo de la invención, o con un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo de la invención.

[00176] Los anticuerpos de la presente invención se pueden combinar de forma sinérgica con uno o más fármacos contra el cáncer o terapia utilizada para tratar el cáncer, incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células renales, cáncer colorrectal, glioblastoma multiforme, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer de ovario, adenocarcinoma, cáncer de próstata, glioma y melanoma. Se contempla en el presente documento para utilizar anticuerpos anti-PD-1 de la invención en combinación con terapias inmunoestimulantes y/o de soporte inmuno para inhibir el crecimiento tumoral, y/o mejorar la supervivencia de pacientes con cáncer. Las terapias inmunoestimulantes incluyen terapias

inmunoestimulantes directas para aumentar la actividad de las células inmunes por cualquiera de “soltar el freno” sobre las células inmunes suprimidas o “pisar el acelerador” para activar una respuesta inmune. Los ejemplos incluyen dirigir otros receptores de punto de control, vacunación y adyuvantes. Las modalidades de soporte inmuno pueden aumentar la antigenicidad del tumor mediante la promoción de la muerte celular inmunogénica, inflamación o tener otros efectos indirectos que promueven una respuesta inmune anti-tumoral. Ejemplos incluyen radiación, quimioterapia, agentes anti-angiogénicos y cirugía.

[00177] En diversas formas de realización, uno o más anticuerpos de la presente invención se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo para PD-L1, un segundo anticuerpo para PD-1 (por ejemplo, nivolumab), un inhibidor de LAG-3, un inhibidor de CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de TIM3, un inhibidor de BTLA, un inhibidor de TIGIT, un inhibidor de CD47, un antagonista de otro co-inhibidor o ligando de células T (por ejemplo, un anticuerpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 o VISTA), un inhibidor de indoleamin-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [por ejemplo, un “Trampa de VEGF” como aflibercept u otra proteína de fusión de inhibición de VEGF tal como se expone en el documento US 7.087.411 o su fragmento de unión a anticuerpo o antígeno anti-VEGF (por ejemplo, bevacizumab o ranibizumab) o un inhibidor de quinasa de molécula pequeña del receptor de VEGF (por ejemplo, sunitinib, sorafenib o pazopanib)], un inhibidor de Ang2 (por ejemplo, nesvacumab), un inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), un inhibidor del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, erlotinib, cetuximab), un agonista para un receptor co-estimulante (por ejemplo, un agonista para la proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides), un anticuerpo para un antígeno específico de tumor (por ejemplo, CA9, CA125, antígeno asociado a melanoma 3 (MAGE3), antígeno carcinoembrionario (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico de la próstata (PSA), mucina-1, MART-1 y CA19-9), una vacuna (por ejemplo, Bacillus de Calmette-Guerin, una vacuna contra el cáncer), un adyuvante para aumentar la presentación de antígenos (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos), un anticuerpo bi-específico (por ejemplo, anticuerpo bi-específico CD3xCD20, anticuerpo bi-específico PSMAxCD3), una citotoxina, un agente quimioterapéutico (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorubicina, cisplatino, carboplatino, gemcitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel y vincristina), radioterapia, un inhibidor de IL-6R (por ejemplo, sarilumab), un inhibidor de IL-4R (por ejemplo, dupilumab), un inhibidor de IL-10, una citoquina tal como IL-2, IL-7, IL-21, y IL-15, un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) (por ejemplo, anti-CD19-DM4 ADC y anti-DS6-DM4 ADC), un fármaco anti-inflamatorio (por ejemplo, corticosteroides y fármacos no esteroideos anti-inflamatorios), un suplemento dietético tales como anti-oxidantes o cualquier cuidado paliativo para tratar el cáncer. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la presente invención se pueden utilizar en combinación con vacunas contra el cáncer que incluyen vacunas de células dendríticas, virus oncolíticos, vacunas de células tumorales, etc., para aumentar la respuesta anti-tumor. Ejemplos de vacunas contra el cáncer que se pueden utilizar en combinación con anticuerpos anti-PD-1 de la presente invención incluyen vacuna MAGE3 para el melanoma y cáncer de vejiga, vacuna MUC1 para el cáncer de mama, EGFRv3 (por ejemplo, rindopepimut) para cáncer de cerebro (incluyendo glioblastoma multiforme) o ALVAC-CEA (para CEA + cánceres).

[00178] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención se pueden administrar en combinación con terapia de radiación en métodos para generar respuestas anti-tumorales duraderas a largo plazo y/o mejorar la supervivencia de pacientes con cáncer. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención se pueden administrar antes, simultáneamente o después de la administración de la terapia de radiación a un paciente de cáncer. Por ejemplo, la terapia de radiación se puede administrar en una o más dosis a lesiones tumorales seguida de la administración de una o más dosis de anticuerpos anti-PD-1 de la invención. En algunas formas de realización, la terapia de radiación se puede administrar localmente a una lesión tumoral para mejorar la inmunogenicidad local del tumor de un paciente (radiación adjuvante) y/o para matar las células tumorales (ablación por radiación) seguido de la administración sistémica de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención. Por ejemplo, la radiación intracraneal se puede administrar a un paciente con cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma multiforme), en combinación con la administración sistémica de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención. En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención se pueden administrar en combinación con terapia de radiación y un agente quimioterapéutico (por ejemplo, la temozolomida) o un antagonista de VEGF (por ejemplo, aflibercept).

[00179] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más fármacos anti-virales para tratar infección viral crónica causada por LCMV, VIH, VPH, VHB o VHC. Ejemplos de fármacos anti-virales incluyen, pero no están limitados a, zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina y corticosteroides. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención pueden administrarse en combinación con un inhibidor de LAG3, un inhibidor de CTLA-4 o cualquier antagonista de otro co-inhibidor de células T para tratar infección viral crónica.

[00180] En ciertas formas de realización, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención se pueden combinar con un anticuerpo para un receptor de Fc en las células inmunes para el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En una forma de realización, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención se administra en combinación con un anticuerpo o proteína de unión a antígeno dirigido a un antígeno específico a tejido autoinmune. En ciertas formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención se administra en combinación con un anticuerpo o proteína de unión a antígeno que se dirige a un receptor de células T o un receptor de células B, incluyendo pero sin limitarse a, Fc α (por ejemplo, CD89), Fc γ gamma (por ejemplo, CD64, CD32, CD16a, y CD16b), CD19, etc. Los anticuerpos de fragmentos de los mismos de la invención se pueden utilizar en combinación con cualquier fármaco o terapia conocida en la técnica (por ejemplo, corticosteroides y otros inmunosupresores) para tratar una enfermedad o trastorno autoinmune que incluye, pero no se limita a, alopecia areata, hepatitis autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, enfermedad inflamatoria intestinal, miopatías inflamatorias, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, vitiligo, pancreatitis autoinmune, urticaria autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes tipo 1, fascitis eosinofílica, enterogastritis eosinofílica, síndrome de Goodpasture, miastenia gravis, artritis psoriásica, fiebre reumática, colitis ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener.

[00181] El o los agentes/componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar antes, simultáneamente o después de la administración del anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención. Para los propósitos de la presente descripción, dichos regímenes de administración se consideran la administración de un anticuerpo anti-PD-1 “en combinación con” un segundo componente terapéuticamente activo.

[00182] El o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto antes de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención. Por ejemplo, un primer componente puede ser considerado para administrarse “antes de” un segundo componente si el primer componente se administra 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes, 15 minutos antes, 10 minutos antes, 5 minutos antes o menos de 1 minuto antes de la administración del segundo componente. En otras formas de realización, el o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención. Por ejemplo, un primer componente puede ser considerado para administrarse “después de” un segundo componente si el primer componente se administra 1 minuto después, 5 minutos después, 10 minutos después, 15 minutos después, 30 minutos después, 1 hora después, 2 horas después, 3 horas después, 4 horas después, 5 horas después, 6 horas después, 12 horas después, 24 horas después, 36 horas después, 48 horas después, 60 horas después, 72 horas después de la administración del segundo componente. En incluso otras formas de realización, el o los componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto simultáneamente con la administración de un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención. La administración “simultanea”, para los propósitos de la presente invención, incluye, por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-PD-1 y un componente terapéuticamente activo adicional para un sujeto en una forma de dosificación única (por ejemplo, co-formulado), o en formas de dosificación separadas administradas al sujeto dentro de aproximadamente 30 minutos o menos una de otra. Si se administra en formas de dosificación separadas, cada forma de dosificación se puede administrar por la misma vía (por ejemplo, tanto el anticuerpo anti-PD-1 como el componente terapéuticamente activo adicional se pueden administrar por vía intravenosa, subcutánea, etc.); De manera alternativa, cada forma de dosificación se puede administrar a través de una vía diferente (por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar por vía intravenosa y el componente terapéuticamente activo adicional se puede administrar por vía subcutánea). En cualquier caso, la administración de las componentes en una forma de dosificación única, en formas de dosificación separadas por la misma vía o en formas de dosificación separadas por diferentes vías se consideran “administración simultanea”, para los propósitos de la presente descripción. Para los propósitos de la presente descripción, la administración de un anticuerpo anti-PD-1 “antes de”, “simultáneamente con” o “después de” (tal como estos términos se definen en el presente documento anteriormente) la administración de un componente terapéuticamente activo adicional se considera la administración de un anticuerpo anti-PD-1 “en combinación con” un componente terapéuticamente activo adicional).

[00183] La presente invención incluye composiciones farmacéuticas en las que un anticuerpo anti-PD-1 de la presente invención es co-formulado con uno o más del o de los componentes terapéuticamente activos adicionales tal como se describe en otra parte en el presente documento utilizando una variedad de combinaciones de dosificación.

[00184] En ejemplos de formas de realización en donde se administra un anticuerpo anti-PD-1 de la invención en combinación con un antagonista de VEGF (por ejemplo, una trampa de VEGF tal como aflibercept), incluyendo la administración de co-formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-PD-1 y un antagonista de VEGF, los componentes individuales se pueden administrar a un sujeto y/o se co-formulan utilizando una variedad de combinaciones de dosificación. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar a un sujeto y/o contener en una co-formulación en una cantidad seleccionada del grupo que consiste de 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 3,5 mg, 4,0 mg, 4,5 mg, 5,0 mg, 6,0 mg, 7,0 mg, 8,0 mg, 9,0 mg y 10,0 mg; y el antagonista de VEGF (por ejemplo, una trampa de VEGF tal como aflibercept) se puede administrar al sujeto y/o contenido en un co-formulación en una cantidad seleccionada del grupo que consiste de 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1,0 mg, 1,1 mg, 1,2 mg, 1,3 mg, 1,4 mg, 1,5 mg, 1,6 mg, 1,7 mg, 1,8 mg, 1,9 mg, 2,0 mg, 2,1 mg, 2,2 mg, 2,3 mg, 2,4 mg, 2,5 mg, 2,6 mg, 2,7 mg, 2,8 mg, 2,9 mg y 3,0 mg. Las combinaciones/co-formulaciones se pueden administrar a un sujeto de acuerdo con cualquiera de los regímenes de administración revelados en otra parte en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, dos veces a la semana, una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada mes, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, etc.

Regímenes administrativos

[00185] De acuerdo con ciertas formas de realización de la presente invención, múltiples dosis de un anticuerpo anti-PD-1 (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-PD-1 y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales mencionados en el presente documento) se pueden administrar a un sujeto durante un curso de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar secuencialmente a un sujeto dosis múltiples de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención. Tal como se utiliza en el presente documento, “administrar secuencialmente” significa que cada dosis de anticuerpo anti-PD-1 se administra al sujeto en un punto diferente en el tiempo, por ejemplo, en días diferentes separada por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis inicial única de un anticuerpo anti-PD-1, seguido por una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-PD-1, y seguido opcionalmente por una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-PD-1. El anticuerpo anti-PD-1 se puede administrar a una dosis entre 0,1 mg/kg a 100 mg/kg.

[00186] Los términos “dosis inicial”, “dosis secundaria” y “dosis terciaria”, se refieren a la secuencia temporal de la administración del anticuerpo anti-PD-1 de la invención. Así, la “dosis inicial” es la dosis que se administra al comienzo del régimen de tratamiento (también conocida como la “dosis de punto de referencia”); las “dosis secundarias” son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las “dosis terciarias” son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener, todas, la misma cantidad de anticuerpo anti-PD-1, pero en general pueden diferir entre sí en términos de la frecuencia de administración. En ciertas formas de realización, sin embargo, la cantidad de anticuerpo anti-PD-1 contenida en las

dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varían de una a otra (por ejemplo, ajustado hacia arriba o hacia abajo según el caso) durante el curso del tratamiento. En ciertas formas de realización, dos o más dosis (por ejemplo, 2, 3, 4 o 5) se administran en el comienzo del régimen de tratamiento como “dosis de carga”, seguido de dosis posteriores que se administran en una base menos frecuente (por ejemplo, “dosis de mantenimiento”).

[00187] En ciertos ejemplos de formas de realización de la presente invención, se administra cada dosis secundaria y/o terciaria 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1 ½, 2, 2 ½, 3, 3 ½, 4, 4 ½, 5, 5 ½, 6, 6 ½, 7, 7 ½, 8, 8 ½, 9, 9 ½, 10, 10 ½, 11, 11 ½, 12, 12 ½, 13, 13 ½, 14, 14 ½, 15, 15 ½, 16, 16 ½, 17, 17 ½, 18, 18 ½, 19, 19 ½, 20, 20 ½, 21, 21 ½, 22, 22 ½, 23, 23 ½, 24, 24 ½, 25, 25 ½, 26, 26 ½ o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase “la dosis inmediatamente anterior”, tal como se utiliza en el presente documento, significa, en una secuencia de múltiples administraciones, la dosis de anticuerpo anti-PD-1 que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin dosis intermedias.

[00188] Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención pueden comprender administrar a un paciente cualquier número de dosis secundaria y/o terciaria de un anticuerpo anti-PD-1. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, sólo se administra una dosis única secundaria al paciente. En otras formas de realización, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis secundarias se administran al paciente. Del mismo modo, en ciertas formas de realización, sólo una dosis única terciaria se administra al paciente. En otras formas de realización, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más) dosis terciarias se administran al paciente.

[00189] En formas de realización que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria se puede administrar a la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria se puede administrar al paciente de 1 a 2 semanas o 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. Del mismo modo, en formas de realización que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria se puede administrar en la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente de 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En ciertas formas de realización de la invención, la frecuencia a la que las dosis secundarias y/o terciarias se administran a un paciente puede variar en el curso del régimen de tratamiento. La frecuencia de administración también puede ajustarse durante el curso del tratamiento por un médico dependiendo de las necesidades del paciente individual luego del examen clínico.

[00190] La presente invención incluye regímenes de administración en donde 2 a 6 dosis de carga se administran a un paciente a una primera frecuencia (por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguido de la administración de dos o más dosis de mantenimiento al paciente sobre una base menos frecuente. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la invención, si las dosis de carga se administran a una frecuencia de, por ejemplo, una vez al mes (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más dosis de carga administradas una vez al mes), entonces la dosis de mantenimiento se pueden administrar al paciente una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada diez semanas, una vez cada doce semanas etc.).

Usos de diagnóstico de los anticuerpos

[00191] Los anticuerpos anti-PD-1 de la presente invención se pueden usar para detectar y/o medir PD-1 en una muestra, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Algunas formas de realización contemplan el uso de uno o más anticuerpos de la presente invención en ensayos para detectar una enfermedad o trastorno tal como cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral crónica. Ejemplos de ensayos de diagnóstico para PD-1 pueden comprender, por ejemplo, el contacto con una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-PD-1 de la invención, en donde el anticuerpo anti-PD-1 está marcado con un marcador detectable o molécula reportera o utilizado como un ligando de captura para aislar selectivamente PD-1 de las muestras de pacientes. De manera alternativa, un anticuerpo anti-PD-1 no marcado se puede utilizar en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que está en sí marcado de manera detectable. La etiqueta o la molécula reportera detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I ; un resto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína, o rodamina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, 13-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, o luciferasa. Los ejemplos de ensayos específicos que se pueden utilizar para detectar o medir PD-L1 en una muestra incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[00192] Las muestras que se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico de PD-1 de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier muestra de tejido o fluido que se puede obtener de un paciente, que contiene cantidades detectables de cualquiera de las proteínas PD-1, o sus fragmentos, en condiciones normales o patológicas. En general, los niveles de PD-1 en una muestra específica obtenidos de un paciente sano (por ejemplo, un paciente no afectado con cáncer o una enfermedad autoinmune) se medirán para establecer inicialmente un punto de referencia, o estándar, del nivel de PD-1. Este nivel de punto de referencia de PD-1 luego se puede comparar contra los niveles de PD-1 medidos en las muestras obtenidas de individuos sospechados de tener una afección relacionada con el cáncer o los síntomas asociados con esta afección.

[00193] Los anticuerpos específicos para PD-1 pueden no contener etiquetas o restos adicionales, o pueden contener una etiqueta o resto N-terminal o C-terminal. En una forma de realización, la etiqueta o resto es biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de una etiqueta (si existe) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie sobre la que está unido el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina N-terminal se orientará de tal manera que la porción C-terminal del péptido estará distal a la superficie.

[00194] Los aspectos de la invención se refieren al uso de los anticuerpos descritos como marcadores para predecir el pronóstico de cáncer o un trastorno autoinmune en pacientes. Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en ensayos de diagnóstico para evaluar el pronóstico de cáncer en un paciente y para predecir la supervivencia.

EJEMPLOS

[00195] Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a aquellos normalmente versados en la técnica una exposición y descripción completa de cómo hacer y utilizar los métodos y composiciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos

para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, la temperatura ambiente es aproximadamente 25°C y la presión es atmosférica o cercana a ella.

Ejemplo 1: generación de anticuerpos humanos para PD-1

[00196] Los anticuerpos humanos para PD-1 se generaron utilizando un fragmento de PD-1 que se encuentra en el rango desde aproximadamente de aminoácidos 25-170 de Acceso del GenBank NP_005009.2 (SEC. ID. NO: 327) con un cambio C935. El inmunógeno se administra directamente, con un adyuvante para estimular la respuesta inmune, a un ratón VELOCIMMUNE® que comprende ADN que codifica regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana. La respuesta inmune de anticuerpos se monitorizó mediante un inmunoensayo de PD-1 específico. Cuando se logró una respuesta inmune deseada se recogieron los esplenocitos y fusionaron con células de mieloma de ratón para conservar su viabilidad y formar líneas celulares de hibridoma. Las líneas celulares de hibridoma se rastrearon y se seleccionaron para identificar líneas celulares que producen anticuerpos de PD-1 específicos. Utilizando esta técnica, y el inmunógeno descrito anteriormente, se obtuvieron varios anticuerpos quiméricos anti-PD-1 (es decir, anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón); ejemplos de anticuerpos generados de esta manera se designaron como H1M7789N, H1M7799N, H1M7800N, H2M7780N, H2M7788N, H2M7790N, H2M7791N, H2M7794N, H2M7795N, H2M7796N y H2M7798N.

[00197] Los anticuerpos anti-PD-1 también se aislaron directamente de las células B positivas para antígeno sin fusión de células de mieloma, tal como se describe en el documento US 2007/0280945A1, que se incorpora específicamente en el presente documento como referencia en su totalidad. Mediante la utilización de este método, se obtuvieron varios anticuerpos anti-PD-1 completamente humanos (es decir, los anticuerpos que poseen dominios variables humanos y dominios constantes humanos); los ejemplos de anticuerpos generados de esta manera se designan de la siguiente manera: H4H9019P, H4xH9034P2, H4xH9035P2, H4xH9037P2, H4xH9045P2, H4xH9048P2, H4H9057P2, H4H9068P2, H4xH9119P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9135P2, H4xH9145P2, H4xH8992P, H4xH8999P, y H4xH9008P.

[00198] Las propiedades biológicas de los ejemplos de anticuerpos que se generan de acuerdo con los métodos de este Ejemplo se describen en detalle en los ejemplos expuestos a continuación.

Ejemplo 2: secuencias de nucleótidos y aminoácidos de región variable de cadena pesada y ligera

[00199] La Tabla 1 expone los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera y CDRs de los anticuerpos anti-PD-1 seleccionados de la invención. Los identificadores de secuencia de ácido nucleico correspondientes se exponen en la Tabla 2.

Tabla 1: identificadores de secuencia de aminoácidos

Designación de Anticuerpo	SEC. ID. NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M7789N	2	4	6	8	10	12	14	16
H1M7799N	18	20	22	24	26	28	30	32
H1M7800N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M7780N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M7788N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M7790N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M7791N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M7794N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M7795N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M7796N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M7798N	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H9019P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4xH9034P2	194	196	198	200	202	204	206	208
H4xH9035P2	210	212	214	216	202	204	206	208
H4xH9037P2	218	220	222	224	202	204	206	208
H4xH9045P2	226	228	230	232	202	204	206	208
H4xH9048P2	234	236	238	240	202	204	206	208
H4H9057P2	242	244	246	248	202	204	206	208
H4H9068P2	250	252	254	256	202	204	206	208
H4xH9119P2	258	260	262	264	202	204	206	208
H4xH9120P2	266	268	270	272	202	204	206	208
H4xH9128 P2	274	276	278	280	202	204	206	208
H4xH9135 P2	282	284	286	288	202	204	206	208
H4xH9145 P2	290	292	294	296	202	204	206	208
H4xH8992P	298	300	302	304	186	188	190	192
H4xH8999P	306	308	310	312	186	188	190	192
H4xH9008P	314	316	318	320	186	188	190	192

Tabla 2: identificadores de secuencia de ácido nucleico

Designación de Anticuerpo	SEC. ID. NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M7789N	1	3	5	7	9	11	13	15
H1M7799N	17	19	21	23	25	27	29	31
H1M7800N	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M7780N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M7788N	65	67	69	71	73	75	77	79
H2M7790N	81	83	85	87	89	91	93	95

H2M7791N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M7794N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M7795N	129	131	133	135	137	139	141	143
H2M7796N	145	147	149	151	153	155	157	159
H2M7798N	161	163	165	167	169	171	173	175
H4H9019P	177	179	181	183	185	187	189	191
H4xH9034P2	193	195	197	199	201	203	205	207
H4xH9035P2	209	211	213	215	201	203	205	207
H4xH9037P2	217	219	221	223	201	203	205	207
H4xH9045P2	225	227	229	231	201	203	205	207
H4xH9048P2	233	235	237	239	201	203	205	207
H4H9057P2	241	243	245	247	201	203	205	207
H4H9068P2	249	251	253	255	201	203	205	207
H4xH9119P2	257	259	261	263	201	203	205	207
H4xH9120P2	265	267	269	271	201	203	205	207
H4xH9128P2	273	275	277	279	201	203	205	207
H4xH9135P2	281	283	285	287	201	203	205	207
H4xH9145P2	289	291	293	295	201	203	205	207
H4xH8992P	297	299	301	303	185	187	189	191
H4xH8999P	305	307	309	311	185	187	189	191
H4xH9008P	313	315	317	319	185	187	189	191

[00200] Los anticuerpos se denominan normalmente en el presente documento de acuerdo con la siguiente nomenclatura: prefijo Fc (por ejemplo, “H4xH”, “H1M”, “H2M”, etc.), seguido por un identificador numérico (por ejemplo, “7789”, “7799”, etc., como se muestra en la Tabla 1), seguido por un sufijo “P”, “P2”, “N”, o “B”. Así, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede ser denominado en el presente documento como, por ejemplo, “H1H7789N”, “H1M7799N”, “H2M7780N”, etc. Los prefijos H4xH, H1M, H2M y H2aM en las designaciones de anticuerpos que se utilizan en el presente documento indican el isotipo de región Fc específico del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo “H4xH” tiene un Fc de IgG4 humana con 2 o más cambios de aminoácidos tal como se describe en el documento US20100331527, un anticuerpo “H1M” tiene un Fc de IgG1 de ratón y un anticuerpo “H2M” tiene un Fc de IgG2 de ratón (isotipo a o b) (todas las regiones variables son completamente humanas tal como se indica por el primer ‘H’ en la designación de anticuerpos). Tal como se apreciará por una persona normalmente versada en la técnica, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc específico, se puede convertir a un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con un Fc de IgG1 de ratón se puede convertir a un anticuerpo con una IgG4 humana, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluyendo las CDRs) -que se indican mediante los identificadores numéricos mostrados en la Tabla 1- seguirán siendo los mismos, y las propiedades de unión a antígeno se espera que sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

[00201] En ciertas formas de realización, los anticuerpos seleccionados con un Fc de IgG1 de ratón se convirtieron a anticuerpos con Fc de IgG4 humana. En una forma de realización, el dominio de Fc de IgG4 comprende una mutación de serina a prolina en la región de bisagra (S108P) para promover estabilización dímica. La Tabla 3 establece los

identificadores de secuencias de aminoácidos de secuencias de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos anti-PD-1 seleccionados con Fc de IgG4 humana.

Tabla 3

Designación de Anticuerpo	SEC. ID. NOs:	
	Cadena Pesada	Cadena Ligera
H4H7798N	330	331
H4H7795N2	332	333
H4H9008P	334	335
H4H9048P2	336	337

[00202] Cada secuencia de cadena pesada en la Tabla 3 que comprende una región variable (V_H o HCVR; que comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3) y una región constante (que comprende C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}). Cada secuencia de cadena ligera en la Tabla 3 comprendía una región variable (V_L o LCVR; que comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3) y una región constante (C_L). La SEC. ID. NO: 330 que comprendía una HCVR que comprende aminoácidos 1-117 y una región constante que comprende aminoácidos 118-444. La SEC. ID. NO: 331 que comprendía una LCVR que comprende aminoácidos 1-107 y una región constante que comprende aminoácidos 108-214. La SEC. ID. NO: 332 que comprendía una HCVR que comprende aminoácidos 1-122 y una región constante que comprende aminoácidos 123-449. La SEC. ID. NO: 333 que comprendía una LCVR que comprende aminoácidos 1-107 y una región constante que comprende aminoácidos 108-214. La SEC. ID. NO: 334 que comprendía una HCVR que comprende aminoácidos 1-119 y una región constante que comprende aminoácidos 120-446. La SEC. ID. NO: 335 que comprendía una LCVR que comprende aminoácidos 1-108 y una región constante que comprende aminoácidos 109-215. La SEC. ID. NO: 336 que comprendía una HCVR que comprende aminoácidos 1-121 y una región constante que comprende aminoácidos 122-448. La SEC. ID. NO: 337 que comprendía una LCVR que comprende aminoácidos 1-108 y una región constante que comprende aminoácidos 109-215.

Ejemplo 3: unión del anticuerpo a PD-1 tal como se determina por resonancia de plasmón de superficie

[00203] Las constantes de asociación de unión y tasa de disociación (k_a y k_d , respectivamente), constantes de disociación de equilibrio y vidas medias de disociación (K_D y $t_{1/2}$, respectivamente) para unión de antígeno a anticuerpos anti-PD1 purificados se determinaron utilizando un ensayo de biosensor de resonancia de plasmón de superficie en tiempo real en un instrumento Biacore 4000 o Biacore T200. La superficie del sensor Biacore se derivatizó con un anticuerpo anti-ratón de conejo policlonal (GE, # BR-1008-38) o con un anticuerpo Fc anti-humano de ratón monoclonal (GE, # BR-1008-39) para capturar aproximadamente 100-900 RU de anticuerpos monoclonales anti-PD-1, expresados ya sea con un Fc de ratón o un Fc humano, respectivamente. Los reactivos de PD-1 probados para la unión a los anticuerpos anti-PD-1 incluyen PD-1 humano recombinante expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (hPD-1-MMH; SEC. ID. NO: 321), PD-1 de mono cynomolgus recombinante expresado con una

etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (MfPD-1-MMH; SEC. ID. NO: 322), dímero PD-1 humano recombinante expresado con ya sea una etiqueta de Fc de IgG2a de ratón C-terminal (hPD-1-mFc; SEC. ID. NO: 323) o con un Fc de IgG1 humana C-terminal (hPD1-hFc; SEC. ID. NO: 324), y PD-1 de mono con mFc (SEC. ID. NO: 329). Diferentes concentraciones de reactivos de PD-1 que van de 200 nM a 3,7 nM se inyectaron sobre la superficie de captura de anticuerpo monoclonal anti-PD-1 a un velocidad de flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ en Biacore 4000 o a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ en Biacore T200. La unión de los reactivos PD-1 a anticuerpos monoclonales capturados se controló durante 3 a 5 minutos, mientras que su disociación de los anticuerpos se controló durante 7 a 10 minutos en buffer de ejecución HBST (0,01 M HEPES pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05% v/v de surfactante P20). Los experimentos se realizaron a 25°C y 37°C. Las constantes de tasa de asociación cinética (k_a) y disociación (K_D) se determinaron mediante el procesamiento y ajuste de los datos a un modelo de unión 1:1 utilizando el software de ajuste de curva Scrubber 2.0c. Se calcularon entonces las constantes de equilibrio de disociación de unión (K_D) y las vidas media disociativas ($t_{1/2}$) a partir de las constantes de velocidad cinética como: $K_D \text{ (M)} = k_d / k_a$ y $t_{1/2} \text{ (min)} = [\ln 2 / (60 * K_D)]$. Los parámetros cinéticos de unión para diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen a diferentes reactivos PD-1 a 25°C y 37°C se tabularon en las Tablas 4-11.

Tabla 4: parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen a PD-1-MMH humano a 25°C

Anticuerpo	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (min)
H2aM7780N	9,32E+03	3,59E-04	3,85E-08	32
H2aM7788N	1,97E+04	3,88E-04	1,96E-08	30
H1M7789N	2,53E+04	5,31E-05	2,10E-09	218
H2aM7790N	4,63E+04	8,23E-04	1,78E-08	14
H2aM7791N	3,01E+04	7,06E-04	2,34E-08	16
H2aM7794N	5,50E+04	2,12E-03	3,80E-08	5,4
H2aM7795N	4,91E+04	1,15E-03	2,35E-08	10
H2aM7796N	6,73E+03	1,93E-03	2,86E-07	6,0
H2aM7798N	1,32E+05	3,06E-04	2,31E-09	38
H1M7799N	5,04E+04	1,23E-02	2,44E-07	0,9
H1M7800N	5,88E+04	9,47E-03	1,61E-07	1,2
H4H9019P	2,05E+04	8,08E-04	3,94E-08	14
H4xH9034P	1,02E+05	1,49E-03	1,45E-08	7,8
H4xH9035P	1,03E+05	4,75E-04	4,62E-09	24
H4xH9037P	7,32E+04	7,95E-04	1,09E-08	15
H4xH9045P	5,40E+04	4,03E-03	7,46E-08	2,9
H4xH9048P2	1,37E+05	1,23E-03	8,95E-09	9,4
H4H9057P2	4,60E+04	1,34E-02	2,91E-07	0,9
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	7,84E+04	1,22E-03	1,56E-08	9,5
H4xH9120P2	3,32E+04	9,98E-04	3,01E-08	12
H4xH9128P2	4,95E+04	7,19E-04	1,45E-08	16

H4xH9135P2	1,17E+05	1,20E-03	1,02E-08	10
H4xH9145P2	3,47E+04	1,34E-03	3,85E-08	8,6
H4xH8992P	1,50E+05	2,13E-02	1,41E-07	0,5
H4xH8999P	2,83E+05	1,23E-03	4,33E-09	9,4
H4xH9008P	4,29E+04	1,33E-03	3,10E-08	8,7
H4H7795N2	6,35E+04	1,48E-03	2,33E-08	8
H4H7798N	1,47E+05	4,43E-04	3,01E-09	26

*NB indica que bajo las condiciones experimentales, el reactivo de PD-1 no se unió al anticuerpo monoclonal anti-PD-1 capturado

Tabla 5: parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen a PD-1-MMH humano a 37°C

Anticuerpo	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t ½ (min)
H2aM7780N	2,72E+04	1,52E-03	5,58E-08	7,6
H2aM7788N	2,88E+04	1,49E-03	5,19E-08	7,7
H1M7789N	4,53E+04	2,95E-04	6,52E-09	39
H2aM7790N	6,13E+04	5,20E-03	8,49E-08	2,2
H2aM7791N	4,18E+04	2,24E-03	5,35E-08	5,2
H2aM7794N	1,20E+05	7,92E-03	6,61E-08	1,5
H2aM7795N	6,75E+04	4,58E-03	6,78E-08	2,5
H2aM7796N	1,09E+04	1,65E-02	1,51E-06	0,7
H2aM7798N	1,73E+05	6,56E-04	3,79E-09	18
H1M7799N	7,94E+04	4,25E-02	5,36E-07	0,3
H1M7800N	7,83E+04	3,99E-02	5,10E-07	0,3
H4H9019P	1,20E+04	5,44E-03	4,53E-07	2,1
H4xH9034P	2,79E+05	1,12E-02	4,02E-08	1,0
H4xH9035P	2,98E+05	4,26E-03	1,43E-08	2,7
H4xH9037P	2,26E+05	6,68E-03	2,95E-08	1,7
H4xH9045P	8,04E+04	5,32E-02	6,62E-07	0,2
H4xH9048P2	3,70E+05	8,60E-03	2,32E-08	1,3
H4H9057P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	2,40E+05	1,04E-02	4,35E-08	1,1
H4xH9120P2	6,88E+04	7,01E-03	1,02E-07	1,6
H4xH9128P2	1,04E+05	4,36E-03	4,20E-08	2,6
H4xH9135P2	4,18E+05	1,11E-02	2,66E-08	1,0
H4xH9145P2	1,31E+05	1,23E-02	9,40E-08	0,9
H4xH8992P	IC*	IC*	IC*	IC*
H4xH8999P	5,99E+05	9,42E-03	1,57E-08	1,2
H4xH9008P	1,29E+05	8,09E-03	6,26E-08	1,4
H4H7795N2	6,41E+04	6,64E-03	1,04E-07	1,7
H4H7798N	2,27E+05	1,70E-03	7,48E-09	7

* NB indica que bajo las condiciones experimentales, el reactivo de PD-1 no se unió al anticuerpo monoclonal anti-PD-1 capturado. IC indica que en las condiciones experimentales, la unión de PD-1 no es concluyente.

Tabla 6: parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen al dímero PD-1 humano (PD-1-mFc humano o PD-1-hFc humano) a 25°C.

Anticuerpo	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t ½ (min)
H2aM7780N	4,21E+04	9,94E-06	2,36E-10	1162
H2aM7788N	8,94E+04	2,82E-05	3,15E-10	410
H1M7789N	3,91E+04	4,31E-05	1,10E-09	268
H2aM7790N	1,86E+05	3,02E-05	1,62E-10	383
H2aM7791N	4,05E+04	1,01E-04	2,49E-09	114
H2aM7794N	1,79E+05	1,06E-04	5,93E-10	109
H2aM7795N	1,38E+05	3,14E-05	2,27E-10	368
H2aM7796N	2,61E+04	8,67E-05	3,32E-09	133
H2aM7798N	3,50E+05	2,29E-05	6,55E-11	505
H1M7799N	2,38E+05	8,55E-05	3,60E-10	135
H1M7800N	1,52E+05	7,72E-05	5,09E-10	150
H4H9019P	4,38E+04	8,61E-05	1,97E-09	134
H4xH9034P	2,15E+05	1,51E-04	7,01E-10	77
H4xH9035P	2,01E+05	1,03E-04	5,13E-10	112
H4xH9037P	1,50E+05	1,29E-04	8,62E-10	89
H4xH9045P	9,13E+04	1,60E-04	1,75E-09	72
H4xH9048P2	2,36E+05	1,88E-04	7,98E-10	61
H4H9057P2	1,01E+05	1,77E-04	1,75E-09	65
H4H9068P2	4,72E+04	2,80E-03	5,94E-08	4
H4xH9119P2	1,63E+05	1,62E-04	9,92E-10	71
H4xH9120P2	6,52E+04	1,19E-04	1,82E-09	97
H4xH9128P2	8,37E+04	1,33E-04	1,59E-09	87
H4xH9135P2	2,12E+05	1,38E-04	6,51E-10	84
H4xH9145P2	6,58E+04	1,58E-04	2,40E-09	73
H4xH8992P	2,35E+05	1,60E-04	6,80E-10	72
H4xH8999P	5,55E+05	1,20E-04	2,17E-10	96
H4xH9008P	3,52E+04	2,80E-05	7,96E-10	412
H4H7795N2	1,50E+05	9,25E-05	6,15E-10	125
H4H7798N	4,41E+05	5,40E-05	1,22E-10	214

Tabla 7: parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen al dímero PD-1 humano (PD-1-mFc humano o PD-1-hFc humano) a 37°C.

Anticuerpo	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t ½ (min)
H2aM7780N	9,94E+04	2,29E-05	2,30E-10	505

H2aM7788N	1,31E+05	2,13E-05	1,63E-10	542
H1M7789N	1,09E+05	1,0E-05	9,17E-11	1155
H2aM7790N	2,01E+05	8,49E-05	4,22E-10	136
H2aM7791N	4,98E+04	1,79E-04	3,59E-09	65
H2aM7794N	4,68E+05	2,11E-04	4,52E-10	55
H2aM7795N	1,65E+05	6,13E-05	3,71E-10	188
H2aM7796N	2,21E+04	4,34E-04	1,96E-08	27
H2aM7798N	4,90E+05	1,40E-05	2,80E-11	825
H1M7799N	4,41E+05	1,81E-04	4,11E-10	64
H1M7800N	4,00E+05	1,81E-04	4,50E-10	64
H4H9019P	7,17E+04	1,95E-04	2,71E-09	59
H4xH9034P	3,02E+05	6,30E-04	2,09E-09	18
H4xH9035P	3,16E+05	5,54E-04	1,75E-09	21
H4xH9037P	2,63E+05	9,21E-04	3,50E-09	13
H4xH9045P	2,14E+05	1,10E-03	5,13E-09	11
H4xH9048P2	3,61E+05	1,10E-03	3,05E-09	10
H4H9057P2	2,33E+05	2,11E-03	9,07E-09	5
H4H9068P2	9,69E+04	1,20E-02	1,24E-07	1
H4xH9119P2	2,40E+05	9,09E-04	3,80E-09	13
H4xH9120P2	8,08E+04	4,82E-04	5,96E-09	24
H4xH9128P2	1,86E+05	6,86E-04	3,68E-09	17
H4xH9135P2	3,10E+05	7,02E-04	2,27E-09	16
H4xH9145P2	1,60E+05	5,71E-04	3,58E-09	20
H4xH8992P	3,49E+05	1,02E-03	2,91E-09	11
H4xH8999P	7,57E+05	4,51E-04	5,96E-10	26
H4xH9008P	5,52E+04	1,0E-05	1,81E-10	1155
H4H7795N2	1,60E+05	2,64E-04	1,65E-09	44
H4H7798N	6,60E+05	1,15E-04	1,75E-10	100

Tabla 8: parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen a MfPD-1-MMH a 25°C.

Anticuerpo	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)	t ½ (min)
H2aM7780N	1,00E+04	3,15E-04	3,15E-08	37
H2aM7788N	8,63E+03	6,62E-04	7,66E-08	17
H1M7789N	1,55E+04	1,23E-04	7,89E-09	94
H2aM7790N	3,11E+04	9,37E-04	3,01E-08	12
H2aM7791N	1,61E+04	5,53E-04	3,44E-08	21
H2aM7794N	3,60E+04	5,99E-03	1,66E-07	1,9
H2aM7795N	4,44E+04	8,89E-04	2,01E-08	13
H2aM7796N	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM7798N	8,72E+04	3,93E-04	4,50E-09	29
H1M7799N	5,78E+04	1,30E-02	2,24E-07	0,9
H1M7800N	5,89E+04	1,04E-02	1,76E-07	1,1

H4H9019P	1,94E+04	8,33E-04	4,29E-08	14
H4xH9034P	9,61E+04	2,69E-03	2,80E-08	4,3
H4xH9035P	9,36E+04	4,34E-04	4,64E-09	27
H4xH9037P	6,99E+04	9,15E-04	1,31E-08	13
H4xH9045P	6,25E+04	7,05E-03	1,13E-07	1,6
H4xH9048P2	1,28E+05	8,97E-04	7,00E-09	13
H4H9057P2	3,46E+04	1,91E-02	5,51E-07	0,6
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4xH9119P2	7,50E+04	1,66E-03	2,22E-08	6,9
H4xH9120P2	3,17E+04	1,08E-03	3,41E-08	11
H4xH9128P2	3,68E+04	6,49E-04	1,77E-08	18
H4xH9135P2	1,24E+05	1,31E-03	1,06E-08	8,8
H4xH9145P2	2,86E+04	1,24E-03	4,31E-08	9,3
H4xH8992P	1,88E+05	3,76E-02	2,00E-07	0,3
H4xH8999P	4,29E+05	1,33E-03	3,09E-09	8,7
H4xH9008P	1,05E+05	2,49E-03	2,38E-08	4,6
H4H7795N2	6,59E+04	1,48E-03	2,24E-08	8
H4H7798N	1,43E+05	5,51E-04	3,86E-09	21

*NB indica que bajo las condiciones experimentales, el reactivo de PD-1 no se unió al anticuerpo monoclonal anti-PD-1 capturado.

Tabla 9: parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen a MfPD-1-MMH a 37°C.

Anticuerpo	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t ½ (min)
H2aM7780N	2,29E+04	1,38E-03	6,05E-08	8,3
H2aM7788N	1,88E+04	3,28E-03	1,74E-07	3,5
H1M7789N	4,79E+04	4,08E-04	8,50E-09	28
H2aM7790N	2,55E+04	6,93E-03	2,71E-07	1,7
H2aM7791N	3,79E+04	1,91E-03	5,05E-08	6,0
H2aM7794N	6,66E+04	2,01E-02	3,02E-07	0,6
H2aM7795N	6,47E+04	3,89E-03	6,02E-08	3,0
H2aM7796N	NB*	NB*	NB*	NB*
H2aM7798N	1,42E+05	9,93E-04	7,00E-09	12
H1M7799N	8,80E+04	4,67E-02	5,30E-07	0,2
H1M7800N	8,40E+04	4,43E-02	5,27E-07	0,3
H4H9019P	2,14E+04	7,63E-03	3,56E-07	1,5
H4xH9034P	2,83E+05	2,47E-02	8,73E-08	0,5
H4xH9035P	3,06E+05	4,29E-03	1,40E-08	2,7
H4xH9037P	2,22E+05	8,80E-03	3,97E-08	1,3
H4xH9045P	1,40E+04	1,05E-01	7,54E-06	0,1
H4xH9048P2	4,15E+05	6,97E-03	1,68E-08	1,7
H4H9057P2	NB*	NB*	NB*	NB*
H4H9068P2	NB*	NB*	NB*	NB*

H4xH9119P2	2,40E+05	1,23E-02	5,14E-08	0,9
H4xH9120P2	6,98E+04	7,48E-03	1,07E-07	1,5
H4xH9128P2	9,06E+04	4,18E-03	4,61E-08	2,8
H4xH9135P2	4,62E+05	1,34E-02	2,89E-08	0,9
H4xH9145P2	1,71E+05	1,43E-02	8,37E-08	0,8
H4xH8992P	IC*	IC*	IC*	IC*
H4xH8999P	9,83E+05	9,26E-03	9,41E-09	1,2
H4xH9008P	5,86E+05	1,38E-02	2,35E-08	0,8
H4H7795N2	7,80E+04	6,89E-03	8,83E-08	1,7
H4H7798N	2,13E+05	2,23E-3	1,05E-08	5

*NB indica que bajo las condiciones experimentales, el reactivo PD-1 no se unió al anticuerpo monoclonal anti-PD-1 capturado. IC indica que en las condiciones experimentales, la unión de PD-1 no es concluyente.

Tabla 10: parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen al dímero PD-1 de mono (PD-1-mFc de mono) a 25°C.

Anticuerpo	Cantidad de mAb Capturado (RU)	100nM PD-1-mFc de mono unido (RU)	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t ½ (min)
H4H9019P	116	31	4,55E+04	8,96E-05	1,97E-09	129
H4xH9034P	215	95	2,03E+05	1,66E-04	8,18E-10	70
H4xH9035P	153	78	2,16E+05	9,96E-05	4,60E-10	116
H4xH9037P	137	58	1,50E+05	1,37E-04	9,12E-10	84
H4xH9045P	202	78	9,78E+04	1,68E-04	1,72E-09	69
H4xH9048P2	227	115	2,43E+05	1,84E-04	7,54E-10	63
H4H9057P2	196	75	1,02E-1-05	3,03E-04	2,98E-09	38
H4H9068P2	178	17	5,70E+04	3,09E-03	5,42E-08	4
H4xH9119P2	209	83	1,63E+05	1,72E-04	1,05E-09	67
H4xH9120P2	195	52	5,84E+04	1,12E-04	1,91E-09	104
H4xH9128P2	175	64	7,87E+04	1,24E-04	1,57E-09	94
H4xH9135P2	150	74	2,38E+05	1,43E-04	6,02E-10	81
H4xH9145P2	304	84	7,24E+04	1,50E-04	2,08E-09	77
H4xH8992P	260	122	2,03E+05	2,51E-04	1,24E-09	46
H4xH8999P	217	126	5,50E-1-05	1,15E-04	2,10E-10	100
H4xH9008P	248	93	1,20E+05	5,77E-05	4,80E-10	200
H4H7795N2	204	60	1,60E+05	9,92E-05	6,21E-10	116
H4H7798N	223	93	4,49E+05	6,14E-05	1,37E-10	188

Tabla 11: parámetros cinéticos de unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 que se unen al dímero PD-1 de mono (PD-1-mFc de mono) a 37°C.

Anticuerpo	Cantidad de mAb	100nM PD-1-mFc de	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	K _D (M)	t ½ (min)
------------	-----------------	-------------------	-----------------------	----------------------	--------------------	-----------

	Capturado (RU)	mono unido (RU)				
H4H9019P	89	36	8,16E+04	2,59E-04	3,17E-09	45
H4xH9034P	184	81	3,07E+05	7,49E-04	2,44E-09	15
H4xH9035P	88	40	3,67E+05	6,23E-04	1,70E-09	19
H4xH9037P	55	24	2,80E+05	8,97E-04	3,21E-09	13
H4xH9045P	161	65	2,41E+05	1,36E-03	5,66E-09	8
H4xH9048P2	184	84	4,94E+05	1,13E-03	2,29E-09	10
H4H9057P2	105	28	1,61E+05	4,77E-03	2,96E-08	2,4
H4H9068P2	90	6	1,21E+05	1,05E-02	8,63E-08	1,1
H4xH9119P2	98	40	2,79E+05	8,85E-04	3,17E-09	13
H4xH9120P2	141	46	8,29E+04	5,02E-04	6,06E-09	23
H4xH9128P2	148	60	1,87E+05	8,16E-04	4,36E-09	14
H4xH9135P2	106	52	3,42E+05	7,94E-04	2,32E-09	15
H4xH9145P2	284	94	1,51E+05	6,09E-04	4,04E-09	19
H4xH8992P	206	86	3,50E+05	1,53E-03	4,38E-09	8
H4xH8999P	160	83	7,30E+05	5,10E-04	7,00E-10	23
H4xH9008P	216	98	2,04E+05	1,00E-05*	4,90E-11*	1155*
H4H7795N2	164	47	1,70E+05	2,90E-04	1,71E-09	40
H4H7798N	203	88	6,30E+05	1,27E-04	2,02E-10	91

*Indica que en las condiciones experimentales actuales, no se observó disociación del reactivo de PD-1 y el valor de K_D se fijó manualmente en 1,00E-05.

[00204] Tal como se muestra en la Tabla 4, a 25°C, 28 de los 29 anticuerpos anti-PD-1 de la invención se unieron a hPD-1-MMH con valores de K_D que van de 2,1 nM a 291 nM. Un anticuerpo, H4H9068P2, no demostró ninguna unión medible a hPD-1-MMH a 25°C. Tal como se muestra en la Tabla 5, a 37°C, 26 de los 29 anticuerpos anti-PD-1 de la invención se unieron a hPD-1-MMH con valores de K_D que van de 3,79 nM a 1,51 pM. Tres anticuerpos de la invención no demostraron ninguna unión concluyente a hPD-1-MMH a 37°C. Tal como se muestra en la Tabla 6, a 25°C, todos los 29 anticuerpos anti-PD-1 de la invención se unieron a proteínas diméricas hPD-1 con valores de K_D que van de 65,5 pM a 59,4 nM. Tal como se muestra en la Tabla 7, a 37°C, todos los 27 anticuerpos anti-PD-1 de la invención se unieron a proteínas diméricas hPD-1 con valores de K_D que van de 3,09 pM a 551 nM. Tal como se muestra en la Tabla 8, a 25°C, 27 de los 29 anticuerpos anti-PD-1 de la invención se unieron a MfPD-1-MMH con valores de K_D que van de 3,09nM a 551 nM. Dos anticuerpos de la invención no demostraron ninguna unión concluyente a MfPD-1-MMH a 25°C. Tal como se muestra en la Tabla 9, a 37°C, 25 de los 29 anticuerpos anti-PD-1 de la invención se unieron a MfPD-1-MMH con valores de K_D que van de 7,00 nM a 7,54 pM. Cuatro anticuerpos de la invención no demostraron ninguna unión concluyente a MfPD-1-MMH a 37°C. Tal como se muestra en la Tabla 10, a 25°C, todos los 18 anticuerpos anti-PD-1 probados de la invención se unieron al dímero MfPD-1 con valores de K_D que van de 137 pM a 54,2 nM. Tal como se muestra en la Tabla 11, a 37°C, todos los 18 anticuerpos anti-PD-1 probados de la invención se unieron al dímero MfPD-1 con valores de K_D que se encuentran en el rango desde menos de 49 pM a 86,3 nM.

Ejemplo 4: bloqueo de unión PD-1 a PD-L1 tal como se determina mediante ELISA

[00205] La capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 para bloquear la unión de PD-1 humano de a su ligando, el receptor de PD-L1, se midió utilizando tres formatos de ELISA sándwich de competencia. Las proteínas diméricas de PD-L1 humano, que constan de una porción del dominio extracelular de PD-L1 humano expresado ya sea con una etiqueta Fc humano C-terminal (hPD-L1-hFc; SEC. ID. N°: 325) o una etiqueta Fc de ratón C-terminal (hPD-L1-mFc; SEC. ID.: 326), o PD-L2 humano dimérica, compuesta por la región extracelular de PD-L2 humano que se produce con una etiqueta Fc humana C-terminal (hPD-L2-hFc; R & D Systems, # 1224-PL) se recubrieron por separado a una concentración de 2 µg/ml en PBS en una placa de microtitulación de 96 pocillos durante la noche a 4°C. Los sitios de unión no específicos se bloquearon posteriormente utilizando una solución 0,5% (p/v) de BSA en PBS. En un primer formato de competencia, una concentración constante de 1,5 nM de una proteína dimérica PD-1 humano, compuesta por el dominio extracelular de PD-1 humano expresado con una etiqueta Fc C-terminal de ratón (hPD-1-mFc; SEC. ID.: 323) se agregó a las diluciones en serie de anticuerpos anti-PD-1 o anticuerpos de control de isotipo de modo que las concentraciones finales de anticuerpos varió de 0 a 200 nM. En un segundo formato de competición, una concentración constante de 200 pM de proteína de PD-1 humano dimérica biotinilada, compuesta por el dominio extracelular de PD-1 humano que se expresó con una etiqueta de Fc humano C-terminal (biot-hPD-1-hFc; SEC. ID.: 323), se agregó de manera similar a las diluciones en serie de anticuerpos anti-PD-1 o un control de isotipo de concentraciones de anticuerpos finales que van de 0 a 50 nM. En un tercer formato de competición, una concentración constante de 100 pM de la proteína dimérica de hPD-1-mFc se agregó de manera similar a diluciones en serie de anticuerpos anti-PD-1 o un control de isotipo de concentraciones de anticuerpos finales que van de 0 a 100 nM. Estos complejos de anticuerpo-proteína fueron entonces incubados durante 1 hora a temperatura ambiente (TA). Los complejos anticuerpo-proteína con 1,5 nM de hPD-1-mFc constante se transfirieron a placas de microtitulación recubiertas con hPD-L1-hFc, complejos de anticuerpo-proteína con 200 pM de biot-hPD-1-hFc constante se transfirieron a placas recubiertas de hPD-L1-mFc, y los complejos de anticuerpo-proteína con 100 pM de hPD-1-mFc constante se transfirieron a placas de microtitulación recubiertas con hPD-L2-hFc. Después de incubar durante 1 hora a TA, se lavaron los pocillos, y la hPD-1-mFc unida a placa se detectó con un anticuerpo policlonal anti-mFc conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch Inc., # 115-035-164), y el bioth-PD-1-hFc unido a placa se detectó con estreptavidina conjugada con HRP (Thermo Scientific, # N200). Las muestras se desarrollaron con una solución de TMB (BD Biosciences, # 51-2606KC y # 51-2607KC) para producir una reacción colorimétrica y luego el desarrollo de color se estabilizó mediante adición de ácido sulfúrico 1 M antes de medir la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Victor X5. Los análisis de datos fueron realizados mediante un modelo de dosis-respuesta sigmoidal dentro del software PrismTM (GraphPad). El valor de IC₅₀ calculado, definido como la concentración de anticuerpo requerido para reducir el 50% de la unión de PD-1 humano a PD-L1 o PD-L2 humano, se usó como indicador de la potencia de bloqueo. El porcentaje de bloqueo máximo se calculó como una medida de la capacidad de los anticuerpos para bloquear completamente la unión de PD-1 humano a PD-L1 o PD-L2 humano en la placa, tal como se determina a partir de la curva de dosis. Este bloqueo máximo de porcentaje se calculó restando del 100% la relación de la reducción de la señal observada en presencia de

la concentración más alta probada para cada anticuerpo en relación con la diferencia entre la señal observada para una muestra de PD-1 humano que no contiene anticuerpo anti-PD-1 (0% de bloqueo) y la señal de fondo de el anticuerpo secundario conjugado con HRP solo (100% de bloqueo).

[00206] El porcentaje de bloqueo máximo y los valores de IC_{50} calculados para los anticuerpos de bloqueo mayores al 35% de la señal de unión de hPD-1 se muestran en las Tablas 12-14. Los anticuerpos que mostraron una disminución en la señal de unión de hPD-1 del 35% o menos se definieron como los no-bloqueantes. Los anticuerpos que mostraron un incremento del 35% o más en la señal de unión del PD-1 humano se caracterizaron como no-bloqueantes/potenciadores. La base teórica del ensayo, que se define como la concentración de anticuerpo mínimo necesaria teóricamente para ocupar 50% de los sitios de unión de PD-1 humano en el ensayo, es 0,75 nM para el formato que utiliza 1,5 nM de hPD-1-mFc constante, 100 pM para el formato que utiliza 200 pM de biot-HPD-1-hFc constante y 50 pM para el formato que utiliza 100 pM de hPD-1-rinFc constante, lo que indica que los valores de IC_{50} calculados inferiores pueden no representar unión de sitio anticuerpo-proteína cuantitativo. Por esta razón, los anticuerpos con valores de IC_{50} calculados de menos de 0,75 nM en el ensayo con hPD-1-mFc constante y recubrimiento de hPD-L1, menos de 100 pM en el ensayo con biot-hPD-1-hFc constante y recubrimiento de hPD-L1, y menos de 50 pM en el ensayo con hPD-1-mFc constante y recubrimiento de hPD-L2 se reportan en las Tablas 12 a 14 como $<7,5E-10M$, $<1,0E-10M$ y $<5,0E-11M$, respectivamente.

Tabla 12: ELISA de Bloqueo de unión de PD-1 humano a PD-L1 humano por anticuerpos anti-PD-1

Anticuerpo	Bloqueo 1,5 nM de la unión de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc, IC_{50} (M)	200nM de anticuerpo que bloquea 1,5 nM de la unión de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc, % de bloqueo
H4H9019P	1,3E-09	98
H4xH9034P	5,1E-10*	98
H4xH9045P	2,8E-10*	98
H4xH9048P2	3,3E-09	67
H4xH9120P2	1,0E-09	98
H4xH9128P2	6,4E-10*	98
H4xH9035P	6,2E-10*	99
H4xH9135P2	1,1E-09	97
H4xH9145P2	9,3E-10	90
H4xH9119P2	2,0E-10*	78
H4H9057P2	1,9E-10*	98
H4H9068P2	NBI/Potenciador	-142
H4xH9037P	8,9E-10	100
H2aM7780N	6,9E-10*	94
H2aM7788N	2,2E-10*	74
H1M7789N	NBI/ Potenciador	-170

H2aM7790N	1,5E-09	74
H2aM7791N	NBI/ Potenciador	-154
H2aM7794N	1,1E-09	95
H2aM7795N2	8,6E-10	93
H2aM7796N	NBI	-20
H2aM7798N	6,8E-10*	93
H1M7799N	2,2E-10*	82
H1M7800N	6,0E-10*	83
H4xH8992P	1,3E-09	93
H4xH8999P	1,3E-09	88
H4xH9008P	2,4E-09	88
Control de isotipo 1	NBI	-3
Control de isotipo 2	NBI	-34
Control de isotipo 2	NBI	-7
Control de isotipo 2	NBI	-16

Base teórica del ensayo: para bloquear ELISA con hPD-1-mFc constante y recubrimiento de hPD-L1 es 7,5E-10 M

(*) - Debajo de la base teórica del ensayo;

NT-no probado; NBI - no bloqueador;

NBI/Potenciador - no bloqueador/potenciador; IC - no concluyente

Tabla 13: ELISA de bloqueo de la unión de PD-1 humano biotinilado a PD-L1 humano mediante los anticuerpos anti-PD-1

Anticuerpo	Bloqueo 200pM De la unión biot-hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc, C_{150} (M)	50nM Anticuerpo que bloquea 200pM de la unión de biot-hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc, % de bloqueo
H4H9019P	6,4E-10	97
H4xH9034P	6,6E-11*	96
H4xH9045P	1,3E-10	95
H4xH9048P2	IC	76
H4xH9120P2	3,9E-10	96
H4xH9128P2	1,9E-10	97
H4xH9035P	8,0E-11*	95
H4xH9135P2	1,5E-10	96
H4xH9145P2	3,5E-10	97
H4xH9119P2	8,2E-11*	96
H4H9057P2	NBI/Potenciador	-57
H4H9068P2	NBI/Potenciador	-43
H4xH9037P	7,8E-11*	95
H2aM7780N	9,1E-11*	100
H2aM7788N	6,5E-11*	100
H1M7789N	NBI	9

H2aM7790N	1,9E-10	99
H2aM7791N	NBI/Potenciador	-45
H2aM7794N	2,3E-10	99
H2aM7795N2	6,9E-11”	99
H2aM7796N	1,3E-09	60
H2aM7798N	7,3E-11*	100
H1M7799N	5,9E-11*	100
H1M7800N	6,5E-11*	99
H4xH8992P	1,6E-10	97
H4xH8999P	1,8E-10	92
H4xH9008P	1,3E-09	93
Control de isotipo 1	NBI	19
Control de isotipo 2	NBI	35
Control de isotipo 2	NBI	-18
Control de isotipo 2	NBI	-11

Base teórica del ensayo: para bloquear ELISA con biot-hPD-1-mFc constante y recubrimiento de hPD-L1 es 1,0E-10 M

(*) - Debajo de la base teórica del ensayo;

NT-no probado; NBI - no bloqueador;

NBI/Potenciador - no bloqueador/potenciador; IC - no concluyente

Tabla 14: ELISA de bloqueo de la unión de PD-1 humano a PD-L2 humano mediante los anticuerpos anti-PD-1

Anticuerpo	Bloqueo 100pM de la unión de hPD-1- mFc a hPD-L2- hFc, IC ₅₀ (M)	100nM Anticuerpo que bloquea 100pM de la unión de hPD-1-mFc a hPD-L2 hFc, % de bloqueo
H4xH9048P2	1,4E-10	98
H2aM7795N2	2,6E-10	100
H2aM7798N	1,3E-10	100
H4xH9008P	1,3E-09	94
Control de isotipo 2	NBI	-27

Base teórica del Ensayo: bloqueando ELISA con hPD-1-mFc constante y recubrimiento de hPD-L2 es 5,0E-11 M

NBI - no-bloqueador

[00207] Tal como se indica en la Tabla 12, en el primer formato de ensayo, 23 de los 27 anticuerpos anti-PD-1 bloquearon 1,5 nM de hPD-1-mFc de la unión a hPD-L1-hFc con valores de IC₅₀ que van de 190 pM a 3,3 nM con el porcentaje de bloqueo máximo que va de 67% a 100%. Un anticuerpo, H2aM7796N, se identificó como un no-bloqueador. Tres anticuerpos anti-PD-1 (H4H9068P2, H1M7789N y H2aM7791N) fueron identificados como los no-bloqueadores/potenciadores.

[00208] Tal como se muestra en la Tabla 13, en el segundo formato de ensayo, 23 de los 27 anticuerpos anti-PD-1 bloquearon 200 pM de biot-hPD-1-hFc de la unión a hPD-L1-mFc con valores de IC₅₀ que van de 59 pM a 1,3 nM con porcentaje de bloqueo máximo que va de 60% a 101%. Un anticuerpo, H1M7789N, se identificó como un no-bloqueador. Tres anticuerpos anti-PD-1 (H4H9057P2, H4H9068P2 y H2aM7791N) fueron identificados como no bloqueadores/potenciadores.

[00209] En el tercer formato de ensayo, tal como se muestra en la Tabla 14, se probaron cuatro anticuerpos anti-PD-1 de la invención y un control de isotipo. Todos los 4 anticuerpos anti-PD-1 de la invención bloquearon 100 pM (concentración fija) de hPD-1-mFc de la unión a hPD-L2-hFc de la placa recubierta con valores de IC₅₀ que van de 0,13 nM a 1,3 nM y con el porcentaje de bloqueo máximo que va de 94% a 100%.

Ejemplo 5: bloqueo de la unión de PD-1 a PD-L1 tal como se determina mediante el ensayo de biosensor y mediante resonancia de plasmón de superficie

[00210] Se estudió la inhibición de la unión de PD-1 a PD-L1 humano mediante diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-1 ya sea utilizando el ensayo de interferometría de bio-capa en tiempo real en un instrumento biosensor Octet Red96 (Fortebio Inc.) o mediante el uso de un ensayo de biosensor de resonancia de plasmón de superficie en tiempo real en un instrumento Biacore 3000.

[00211] Los estudios de inhibición de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 expresados con un Fc de ratón se realizaron en un instrumento Octet Red 96. En primer lugar, 100 nM de PD-1 humano recombinante expresado con una etiqueta de Fc de IgG2a de ratón C-terminal (hPD-1-mFc; SEC. ID. NO: 323) se incubó con 500 nM de cada anticuerpo monoclonal anti-PD-1 durante al menos 1 hora antes de ejecutar el ensayo de inhibición. Alrededor de 0,8 nM a 1,2 nM de PD-L1 humano recombinante expresado con una etiqueta de Fc de IgG1 humana C-terminal (hPD-L1-hFc; SEC. ID. NO: 325) se capturó utilizando biosensor Octeto de captura de Fc de IgG anti-humana. Los biosensores Octet recubiertos con hPD-L1-hFc se sumergieron en los pocillos que contienen la mezcla de hPD-1-mFc y diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-1. Todo el experimento se realizó a 25°C en el buffer de HBST Octet (0,01 M de HEPES pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05% v/v de tensioactivo P20, 0,1 mg/ml de BSA) con la placa de agitación a una velocidad de 1000rpm. Los biosensores se lavaron en buffer de HBST Octet entre cada etapa del experimento. Las respuestas de unión en tiempo real fueron monitorizadas durante todo el transcurso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada etapa. La unión de hPD-1-mFc para hPD-L1-hFc capturado se comparó en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-1 y se utilizó para determinar el comportamiento de bloqueo de los anticuerpos ensayados tal como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15: inhibición de la unión de PD-L1 humano a PD-1 mediante anticuerpos monoclonales anti-PD-1 expresados con el Fc de ratón que se mide en un instrumento Octet Red 96

Anticuerpo Anti-PD-1	Cantidad de hPD- L1-hFc Capturado (nm)	Unión de la mezcla de 100nM de hPD- 1-mFc y 500nM de	% de Bloqueo
---------------------------------	---	---	---------------------

		anticuerpo monoclonal anti- PD-1 (nm)	
Sin Anticuerpo	0,77	0,07	0
H2aM7780N	1,07	-0,01	114
H2aM7788N	0,74	0,00	100
H1M7789N	0,80	0,05	29
H2aM7790N	0,90	-0,01	114
H2aM7791N	1,17	0,23	-229
H2aM7794N	0,87	-0,01	114
H2aM7795N	0,28	-0,01	114
H2aM7796N	0,82	-0,02	129
H2aM7798N	0,85	0,01	86
H1M7799N	0,79	0,00	100
H1M7800N	0,96	0,00	100

[00212] Tal como se muestra en la Tabla 15, 9 de los 11 anticuerpos anti-PD-1 ensayados en el instrumento Octet Red 96 demostraron fuerte bloqueo de hPD-1-mFc de la unión a hPD-L1-hFc que oscila de 86% al finalizar el bloqueo de la unión. Un anticuerpo anti-PD-1 (H1M7789N) ensayado mostró bloqueo más débil de la unión de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc con el 29% de bloqueo. Un anticuerpo (H2aM7791N) ensayado demostró la capacidad de mejorar la unión de hPD-1-mFc a hPD-L1-hFc.

[00213] A continuación, los estudios de inhibición para los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 expresados con Fc humano se realizaron en un instrumento Biacore 3000. En primer lugar, 100 nM de PD-1 humano recombinante expresado con una etiqueta de Fc de IgG1 humana C-terminal (hPD-1-hFc; SEC. ID.: 324) se incubó con 500 nM de cada anticuerpo monoclonal anti-PD-1 durante al menos 2 horas antes de ejecutar el ensayo de inhibición. Una superficie del sensor CM5 Biacore se derivatizó primero con el anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón (GE Catálogo # BR-1008/38) utilizando la química estándar EDC-NHS. Alrededor de 730 RU de PD-L1 humano recombinante que se expresa con una etiqueta de Fc de IgG2a de ratón C-terminal (hPD-L1.mFc; SEC. ID.: 326) se capturó entonces seguido por la inyección de 100 nM de hPD-1.hFc en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-1 a una velocidad de flujo de 25 µl/min durante 3 minutos. Todo el experimento se realizó a 25°C en buffer de ejecución compuesto de 0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,05% v/v de surfactante Tween-20 (HBS-ET buffer de ejecución). Las respuestas de unión en tiempo real se monitorizaron durante todo el transcurso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada etapa. La unión de hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc capturado se comparó en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-1 y se utilizó para determinar el comportamiento de bloqueo de los anticuerpos ensayados tal como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16: inhibición de la unión de PD-L1 humano a PD-1 mediante los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 expresados con Fc humano tal como se mide en un instrumento Biacore 3000.

Anticuerpo monoclonal Anti-PD-1	500nM de anticuerpo monoclonal anti-PD-1 (RU)	Unión de la mezcla de 100nM de hPD-1.hFc y 500nM de anticuerpo monoclonal anti-PD-1 (RU)	% de Bloqueo
Sin Anticuerpo	N/A	100 ± 1,78	N/A
H4H9019P	-2	-1	101
H4xH9034P	-4	-5	105
H4xH9035P	-3	-4	104
H4xH9037P	-4	-4	104
H4xH9045P	-4	-5	105
H4H9048P2	-7	9	91
H4H9057P2	58	57	43
H4H9068P2	-2	365	-265
H4xH9119P2	-5	-5	105
H4xH9120P2	1	0	100
H4xH9128P2	-5	-5	105
H4xH9135P2	-3	-3	102
H4xH9145P2	-8	-6	106
H4xH8992P	3	2	98
H4xH8999P	1	0	100
H4xH9008P	0	1	99
H4H7795N2	-5	-6	106
H4H7798N	-6	-6	106
H4H9008P	-7	-7	107
H4H9048P2	-4	6	94

[00214] Tal como se muestra en la Tabla 16, 18 de 20 anticuerpos anti-PD-1 de la invención ensayados en el instrumento Biacore 3000 demostraron fuerte bloqueo de hPD-1-hFc de la unión a hPD-L1-mFc con el bloqueo que va de 96% a 100%. Un anticuerpo demostró la capacidad para mejorar la unión de la unión de hPD-1-hFc a hPD-L1-mFc. En este estudio, uno de los anticuerpos ensayados de la invención (H4H9057P2) demostró unión de fondo no específica a la superficie de captura de Fc anti-ratón.

Ejemplo 6: competencia cruzada de Octet entre los anticuerpos anti-PD-1

[00215] La competencia de unión entre los anticuerpos monoclonales anti-PD-1 se determinó utilizando un ensayo de interferometría de bio-capa libre de etiquetas en tiempo real en un biosensor RED384 Octet (Pall ForteBio Corp.). Todo el experimento se realizó a 25°C en 0,01 M de HEPES pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05% v/v de surfactante Tween-20, 0,1 mg/ml de BSA (buffer de HBS-ET Octet) con la placa agitándose a la velocidad de 1000 rpm. Para evaluar si 2 anticuerpos fueron capaces de competir entre sí para unirse a sus respectivos epítopos en un PD-1 humano expresado de modo recombinante con una etiqueta de myc-myc-hexahistidina C-terminal (hPD-1-MMH; SEC.

ID.: 321), se capturó primero alrededor de 0,1 nM de hPD-1-MMH en las puntas del biosensor Octet recubiertas de anticuerpo anti-Penta-His (Pall ForteBio Corp., # 18-5079) sumergiendo las puntas durante 5 minutos en los pocillos que contiene una solución de 50 µg/mL de hPD-1-MMH. Las puntas del biosensor de antígeno capturado se saturan entonces con el primer anticuerpo monoclonal anti-PD-1 (que se denominada en lo sucesivo como mAb-1) mediante la inmersión en los pocillos que contienen solución de 50 µg/ml de mAb-1 durante 5 minutos. Las puntas de biosensor posteriormente se sumergen en los pocillos que contienen una solución de 50 µg/ml de un segundo anticuerpo monoclonal anti-PD-1 (que se denomina en lo sucesivo como mAb-2). Las puntas de biosensor se lavaron en buffer de HBS-ET Octet entre cada etapa del experimento. La respuesta de unión en tiempo real se controló durante el transcurso del experimento y se registró la respuesta de unión al final de cada etapa. La respuesta de unión de mAb-2 a hPD-1-MMH pre-complejado con mAb-1 se comparó y determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-1. Los resultados se resumen en la Tabla 17 (*mAb2s de autocompetencia no figuran).

Tabla 17: competencia cruzada entre pares de anticuerpos anti-PD-1 seleccionados

Primer anticuerpo aplicado (“mAb1”)	Anticuerpo mAb2 que muestran competir con mAb1*
H4xH8992P	H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N
H4xH8999P	H4xH8992P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H1M7799N	H4xH8992P, H4xH8999P, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N
H2aM7780N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P

H1M7800N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H2aM7788N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H2aM7794N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H2aM7798N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H4xH9008P
H4xH9145P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9008P
H4H 9057P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N, H4xH9048P2
H4xH9120P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9048P2

H4xH9128P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H4xH9008P, H4H9066P2, H4xH9048P2
H4H9019P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9119P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9135P2	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9034P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H2aM7788N, H2aM7790N, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H2aM7790N	H4xH8992P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7788N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4xH9034P, H4xH8999P, H4xH9008P
H4xH9035P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N
H4xH9037P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9045P, H2aM7795N, H2aM7791N

H4xH9045P	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9037P, H2aM7795N, H2aM7791N
H2aM7795N	H4xH8992P, H4xH8999P, H1M7799N, H2aM7780N, H1M7800N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4H9057P2, H2aM7788N, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9034P, H4xH9135P2, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7791N
H4xH9008P	H4xH8999P, H2aM7780N, H2aM7794N, H2aM7798N, H4xH9145P2, H4xH9128P2, H2aM7790N, H4H9068P2, H1M7799N, H4xH9048P2
H2aM7791N	H2aM7788N, H4H9057P2, H4H9019P, H4xH9119P2, H4xH9135P2, H4xH9034P, H4xH9035P, H4xH9037P, H4xH9045P, H2aM7795N
H4H9068P2	H4xH9128P2, H4xH9008P, H1M7789N, H4xH9048P2
H1M7789N	H4xH9008P, H4H9068P2, H4xH9048P2
H4xH9048P2	H4H9057P2, H4xH9120P2, H4xH9128P2, H4H9019P, H4xH9008P, H4H9068P2, H1M7799N

[00216] Una segunda competición de unión entre un panel de anticuerpos monoclonales anti-PD-1 seleccionados se determinó utilizando un ensayo de interferometría de bio-capa libre de etiquetas en tiempo real en un biosensor Octet HTX (Pall ForteBio Corp.). Todo el experimento se realizó a 25°C en 0,01 M de HEPES pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,05% v/v de surfactante Tween-20, 0,1 mg/mL de BSA (buffer de HBS-ET Octet) con la placa agitándose a la velocidad de 1000 rpm. Para evaluar si 2 anticuerpos fueron capaces de competir entre sí por la unión a sus respectivos epítomos en el hPD-1-MMH, alrededor de 0,25 nM de hPD-1-MMH se capturó primero en puntas de biosensor Octet recubiertas de anticuerpo anti-Penta-His (ForteBio Inc, # 18-5079), sumergiendo las puntas durante 150 segundos en los pocillos que contienen una solución de 10 µg/mL de hPD-1-MMH. Las puntas de biosensor de antígeno capturado se saturaron luego con un primer anticuerpo monoclonal anti-PD-1 (denominado en lo sucesivo como mAb-1) mediante la inmersión en los pocillos que contienen solución de 100 µg/mL de mAb-1 durante 5 minutos. Las puntas de biosensor posteriormente se sumergieron en pocillos que contienen una solución de 100 µg/mL del segundo anticuerpo monoclonal anti-PD-1 (denominado en lo sucesivo como mAb-2) durante 4 minutos. Todos los biosensores se lavaron en buffer de HBS-ET Octet entre cada etapa del experimento. La respuesta de unión en tiempo real se controló durante el transcurso del experimento y la respuesta de unión al final de cada etapa se registró tal como se muestra en la Figura 2. La respuesta de la unión de mAb-2 a hPD-1-MMH pre-complejado con mAb-1 se comparó y determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-1. Los resultados se resumen en la Tabla 18 (*mAb2s de autocompetencia no figuran).

Tabla 18: competencia cruzada entre pares de anticuerpos anti-PD-1 seleccionados

Primer Anticuerpo aplicado ("mAb1")	Anticuerpos mAb2 que demuestran competir con mAb1*
H4H7795N2	H4H7798N
H4H7798N	H4H7795N2; H4H9008P
H4H9008P	H4H7798N; H4H9068P2
H4H9068P2	H4H9008P; H4H9048P2
H4H9048P2	H4H9068P2

[00217] En las condiciones experimentales descritas en este Ejemplo, H4H7795N2 compitió en forma cruzada con H4H7798N; H4H7798N compitió en forma cruzada con H4H7795N2 y H4H9008P; H4H9008P compitió en forma cruzada con H4H7798N y H4H9068P2; H4H9068P2 compitió en forma cruzada con H4H9008P y H4H9048P2.

Ejemplo 7: unión del anticuerpo a células que sobreexpresan PD-1

[00218] Se determinó la unión de anticuerpos anti-PD-1 a una línea celular de riñón embrionaria humana (HEK293; ATCC, # CRL-1573) transfectados establemente con PD-1 humano de longitud completa (aminoácidos 1 a 289 de número de acceso NP_005009.2) (HEK293/HPD-1) mediante FACS.

[00219] Para el ensayo, las células adherentes se desprendieron utilizando tripsina o buffer de disociación libre de enzimas y bloquearon con medio completo. Las células se centrifugaron y resuspendieron a una concentración de $2,5-6 \times 10^6$ células/mL en PBS frío que contenía 2% de FBS. Las células HEK293 parentales y HEK293/hPD-1 se incubaron luego durante 15-30 min en hielo con 100 nM de cada anticuerpo anti-PD-1. Los anticuerpos no unidos se eliminaron mediante el lavado con D-PBS que contenía 2% de FBS, y las células se incubaron posteriormente con F(ab')₂ secundario conjugado con alofococianina que reconoce ya sea Fc humano (Jackson ImmunoResearch, # 109-136-170) o Fc de ratón (Jackson ImmunoResearch, # 115-136-146) durante 15-30 minutos en hielo. Se lavaron las células con D-PBS que contenía FBS al 2% para eliminar F(ab')₂ secundario no unido y las mediciones de fluorescencia se adquirieron utilizando un citómetro de flujo HyperCyte (IntelliCyt, Inc.) o un citómetro de flujo Accuri (BD Biosciences). Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo (Tree Star).

Tabla 19: unión de FACS de anticuerpos anti-PD-1 para células HEK293/hPD-1 y células parentales HEK293

Anticuerpo	FACS en células parentales HEK293 [MFI]	FACS en células HEK293/hPD-1 [MFI]	Relación de HEK293/hPD-1 con respecto a células parentales HEK293
H1M7789N	262	24166	92,3
H1M7799N	255	6855	26,9

H1M7800N	275	6812	24,7
H2aM7780N	320	23656	73,8
H2aM7788N	305	23112	75,7
H2aM7790N	270	47310	175,5
H2aM7791N	274	4948	18,0
H2aM7794N	270	19127	71,0
H2aM7795N	288	817	2,8
H2aM7796N	297	49755	167,8
H2aM7798N	300	23443	78,1
H4H9019P	111	8610	77,2
H4H9057P2	141	6501	46,1
H4H9068P2	285	1940	6,8
H4xH8992P	358	17502	48,9
H4xH8999P	809	28875	35,7
H4xH9008P	509	26233	51,5
H4xH9034P	147	10115	69,0
H4xH9035P	108	9915	91,7
H4xH9037P	108	8787	81,4
H4xH9045P	95	8884	93,7
H4xH9048P2	102	7196	70,8
H4xH9119P2	109	9142	84,0
H4xH9120P2	109	9975	91,9
H4xH9128P2	135	9081	67,5
H4xH9135P2	114	9380	82,2
H4xH9145P2	226	11552	51,2

[00220] Tal como se muestra en la Tabla 19, 25 de los 27 anticuerpos anti-PD-1 de la invención mostraron unión fuerte a las células HEK293/hPD-1 en comparación con la unión en la línea HEK293 parental. Dos anticuerpos de la invención (H2aM7795N y H4H9068P2) unidos de modo más débil a células que expresan PD-1 humano se compararon con los otros anticuerpos ensayados.

[00221] Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos anti-PD1 de la invención, se determinó la unión dependiente de dosis a una línea celular de riñón embrionaria humana (HEK293; ATCC, # CRL-1573) transfectada establemente con PD-1 humano de longitud completa (aminoácidos 1 a 289 de número de acceso NP_005009.2) (HEK293/HPD-1) mediante FACS.

[00222] Para el ensayo, las células adherentes se desprendieron utilizando tripsina y bloquearon con medio completo. Las células se centrifugaron y resuspendieron a una concentración de 6×10^6 células/mL en buffer de tinción (1% de FBS en PBS). Para determinar la EC_{50} y E_{max} de los anticuerpos anti-PD1, 90 μ L de la suspensión celular se incubó durante 30 minutos en hielo con una dilución en serie de anticuerpos anti-PD-1 y controles diluidos a una concentración final que va de 5 pM a 100 nM (ninguna muestra de mAb se incluyó como control negativo) en buffer de tinción. Las células se centrifugaron a continuación y los sedimentos se lavaron una vez con buffer de tinción para eliminar los anticuerpos no unidos. Las células se incubaron posteriormente durante 30 minutos en hielo, ya sea con F(ab')₂ secundario conjugado con alofocianina que reconoce Fc humano

(Jackson ImmunoResearch, # 109-136-170) o Fc de ratón (Jackson ImmunoResearch, # 115-136-071). Las células se centrifugaron y los sedimentos se lavaron una vez con buffer de tinción para eliminar F(ab')₂ secundario no unido y después se fijaron durante la noche con una dilución 1:1 de Cytfix (BD Biosciences, # 554655) y buffer de tinción. Al día siguiente, las células se centrifugaron y los sedimentos se lavaron una vez con buffer de tinción, se resuspendieron y se filtraron. Las medidas de fluorescencia se adquirieron en citómetro Hypercyt® y se analizaron en ForeCyt™ (IntelliCyt; Albuquerque, NM) para determinar la intensidad de fluorescencia media (MFI). Los valores de EC₅₀ se calcularon a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros a través de una curva de respuesta de 11 puntos utilizando GraphPad Prism. La E_{max} para cada anticuerpo se definió como la unión a la dosis más alta de anticuerpos (100 nM) ensayada.

Tabla 20: unión de FACS dependiente de dosis de anticuerpos anti-PD-1 a las células HEK293/hPD-1

Anticuerpo	EC ₅₀ [M]	Geom. Máx. Promedio [MFI] @ 100nM
H2aM7779N	2,59E-09	16832
H2aM7780N	1,69E-09	18415
H2aM7781N	5,67E-10	13740
H2aM7782N	1,26E-09	17302
H2aM7787N	2,40E-09	15744
H2aM7788N	3,21E-10	14827
H2aM7790N	1,71E-10	19196
H2aM7791N	EC ₅₀ No determinada	1397
H2aM7794N	1,37E-09	16406
H2aM7795N	EC ₅₀ No determinada	624
H2aM7798N	6,985E-11	20900
H1M7799N	3,318E-11	24405
H1M7800N	4,80E-11	20763
H4xH8992P	5,45E-11	11368
H4xH8999P	5,27E-11	28341
H4H9019P	1,40E-09	29201
H4xH9034P	2,09E-10	32388
H4xH9035P	1,15E-10	28708
H4xH9037P	6,74E-10	36441
H4xH9045P	9,17E-11	24662
H4xH9048P2	6,68E-10	33687
H4H9057P2	2,363E-10	19953
H4H9068P2	EC ₅₀ No determinada	639
H4xH9119P2	3,476E-10	37789
H4xH9120P2	4,797E-10	34057
H4xH9128P2	1,551E-09	37167
H4xH9135P2	1,048E-10	32793
H4xH9145P2	2,321E-10	30613

isotipo mIgG1	N/A	200
isotipo mIgG2a	N/A	239
isotipo hIgG4	N/A	459

Tabla 21: Unión de FACS dependiente de dosis de anticuerpos anti-PD-1 a las células HEK293/hPD-1

Anticuerpo	EC ₅₀ [M]	Geom. Máx. Promedio [MFI] @ 100nM
H4H7795N2	No concluyente	15188
H4H7798N	5,09E-10	20305
H4H9008P	No concluyente	32230
H4H9048P2	1,60E-09	39774
H1M7789N	No concluyente	35574
H2aM7796N	4,81E-09	14111
isotipo mIgG1	N/A	858
isotipo mIgG2a	N/A	352
isotipo hIgG4	N/A	809

[00223] Tal como se muestra en la Tabla 20, 25 de 28 anticuerpos anti-PD1 de la invención mostraron unión dependiente de dosis a las células HEK293/hPD-1 con valores de EC₅₀ que van de 33,18 pM a 2,59 nM y valores de E_{max} que van de 37,789 a 11,368 MFI. Tres anticuerpos anti-PD1 de la invención no demostraron una fuerte unión a células HEK293/hPD-1 y, por tanto, no se pudo determinar un valor de EC₅₀. Ninguno de los controles de isotipo demostró ninguna unión medible en este ensayo.

[00224] Tal como se muestra en la Tabla 21, 3 de 6 anticuerpos anti-PD1 de la invención mostraron unión dependiente de dosis a las células HEK293/hPD-1 con valores de EC₅₀ que van de 509 pM a 4,81 nM y valores de E_{max} que van de 39,774 a 14,111 MFI. Tres anticuerpos de la invención ensayados se unieron a las células HEK293/hPD-1, pero no alcanzaron una meseta. Por lo tanto sus valores de EC₅₀ precisos no se pudieron determinar y sus valores de EC₅₀ se refieren como no concluyentes. Ninguno de los controles de isotipo demostró ninguna unión medible en este ensayo.

Ejemplo 8: bloqueo de la regulación por disminución de las células T inducidas por PD-1 en un ensayo reportero de luciferasa de células T/APC

[00225] La activación de células T se logra mediante la estimulación de receptores de células T (TcR) que reconocen péptidos específicos presentados por proteínas de complejo de mayor histocompatibilidad de proteínas de clase I o II sobre células presentadoras de antígeno (APC). Los TcR activados a su vez inician una cascada de eventos de señalización que se pueden monitorear por genes reporteros impulsados por factores de transcripción tales como proteína activadora 1 (AP-1), factor nuclear de células T activadas (NFAT) o potenciador de cadena ligera kappa de factor nuclear de las células B activadas (NFkb). La respuesta de células T se modula a través de participación de co-receptores expresados ya sea constitutiva o induciblemente en células-T. Un receptor tal es PD-1, un regulador negativo de la actividad de células T. La PD-1 interactúa con su ligando, PD-L1, que se

expresa en las células objetivo, incluyendo APC o células cancerosas, y actúa para suministrar señales inhibitorias mediante el reclutamiento de fosfatasa para signalosoma TcR, lo que resulta en la supresión de señalización positiva.

[00226] La capacidad de los anticuerpos anti-PD-1 para antagonizar la señalización mediada por PD-1/PD-L1 a través del receptor de PD-1 en líneas de células T humanas que se evaluó utilizando un ensayo basado en células in vitro se muestra en la Figura 1. El bioensayo se desarrolló para medir la señalización de células T inducida por interacción entre células T y APC mediante la utilización de un cultivo mixto derivado de dos líneas de células de mamíferos: las células Jurkat (una línea celular T inmortalizada) y células Raji (una línea celular B). Para el primer componente del bioensayo, las células Jurkat Clon E6-1 (ATCC, # TIB-152) fueron transducidas con el Cignal Lenti AP-1 Luc Reporter (Qiagen-Sabiosciences, # CLS-011L) según las instrucciones del fabricante. El lentivirus codifica el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor mínimo de CMV, repeticiones en tándem del elemento de respuesta transcripcional inducible por TPA (TRE) y un gen de resistencia a puromicina. La línea celular Jurkat de ingeniería fue posteriormente transducida con una quimera PD-1 que comprende el dominio extracelular de PD-1 humano (aminoácidos de 1 a 170 de PD1 humano; número de acceso NP_005009.2) y los dominios trans-membrana y citoplasmáticos de CD300a humana (aminoácidos 181 a 299 de CD300a humana; número de acceso NP_009192.2). Se seleccionó la línea celular estable resultante (Jurkat/AP1-Luc/hPD1-hCD300a) y se mantiene en RPMI/10% de FBS/penicilina/estreptomicina/glutamina suplementado con 500 ug/ml G418 + 1 ug/ml de puromicina.

[00227] Para el segundo componente del bioensayo, las células Raji (ATCC, # CCL-86) fueron transducidas con el gen de PD-L1 humano (aminoácidos 1-290 de número de acceso NP_054862.1) que se había clonado en un sistema de vector lentiviral (pLEX) (Thermo Scientific Biosystems, # OHS4735). Las células Raji, positivas para PD-L1 (Raji/hPD-L1) se aislaron por FACS utilizando un anticuerpo PD-L1 y mantuvieron en Iscove/10% de FBS/penicilina/estreptomicina/glutamina suplementado con 1 ug/ml de puromicina.

[00228] Para simular la interacción de células T/APC, se utilizó un anticuerpo bi-específico compuesto de un brazo Fab que se une a CD3 en las células T y el otro brazo de unión Fab que se une a CD20 en las células Raji (anticuerpo bi-específico CD3xCD20; por ejemplo, tal como se describe en US20140088295). La presencia de la molécula bi-específica en los resultados del ensayo en la activación de la célula T y APC mediante el puenteo de las subunidades CD3 en las células T a CD20 que se expresa endógenamente en las células Raji. La ligación de CD3 con anticuerpos anti-CD3 ha demostrado que conduce a la activación de las células T. En este bioensayo, los anticuerpos que bloquean la interacción de PD1/PD-L1 rescatan la actividad de las células T mediante la desactivación de la señalización inhibitoria y, posteriormente, conducen a la activación de AP1-Luc aumentada.

[00229] En el bioensayo basado en la luciferasa, RPMI1640 suplementado con 10% de FBS y penicilina/estreptomicina/glutamina se utilizó como medio de ensayo para preparar suspensiones de células y diluciones de anticuerpos para llevar a cabo el rastreo de anticuerpos monoclonales anti-PD1 (mAbs). En el día del rastreo, se determinaron los valores de EC₅₀ de anti-PD1 mAbs, en presencia de una concentración fija de anticuerpo bi-específico CD3xCD20 (30 pM), así como la EC₅₀ del anticuerpo bi-específico solo. En el siguiente orden, se agregaron células y reactivos a placas de 96 pocillos de fondo plano y blanco. Para las determinaciones de anti-PD1 mAb EC₅₀, se preparó primero una

concentración fija de anticuerpo bi-específico CD3xCD20 (final 30 pM) y se agregó a los pocillos de la placa de microtitulación. Luego, se agregaron las diluciones seriadas de 12 puntos de anti-PD1 mAbs y controles (concentraciones finales que van de 1,7 pM a 100 nM; más pocillos con medio de ensayo solo). Para la determinación de EC₅₀ de anticuerpo bi-específico (solo), se agregó el anticuerpo bi-específico, a concentraciones finales que van de 0,17 pM a 10 nM (más pocillos con medio de ensayo solo), a los pocillos de la placa de microtitulación. Posteriormente, se preparó una suspensión celular 2,5x10⁶/ml Raji/hPD-L1 y se agregaron 20 ul por pocillo (número final de células/pocillo 5x10⁴ células). Las placas se dejaron a temperatura ambiente (15-20 minutos), mientras que se preparó una suspensión de 2,5x10⁶/ml de Jurkat/AP1-Luc/hPD1 (ecto)-hCD300a (TM-cito). Se agregó 20 uL de suspensión Jurkat (número final de células/5x10⁴ células) por pocillo. Las placas que contienen el co-cultivo se incubaron durante 5 a 6 horas a 37°C/5% de CO₂. Las muestras se ensayaron por duplicado y se detectó entonces actividad de luciferasa después de la adición de reactivo ONE-Glo™ (Promega, # E6051) y las unidades relativas de luz (RLU) se midieron en un luminómetro Victor.

[00230] Los valores de RLU para cada anticuerpo rastreado se normalizaron mediante el establecimiento de la condición de ensayo con concentración fija (30 pM) del anticuerpo bi-específico CD3/CD20, pero sin anticuerpo anti-PD-1 a 100%. Esta condición corresponde a la máxima respuesta AP1-Luc provocada por la molécula biespecífica en presencia de la señal inhibidora de PD-1/PD-L1. Después de la adición del anticuerpo anti-PD-1, la señal inhibitoria se suprime, y el aumento de la estimulación se muestra aquí como E_{max}, el porcentaje aumenta en la señal en presencia de la dosis de anticuerpo más alta ensayada (100 nM). Para comparar la potencia de los anticuerpos anti-PD-1 ensayados, la concentración de anticuerpo en la que el valor de RLU normalizado alcanzó 150% de activación se determina a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros a través de una curva de respuesta de 12 puntos utilizando GraphPad Prism. Los resultados se resumen en la Tabla 22 y la Tabla 23, respectivamente.

Tabla 22: anticuerpo anti-PD1 que bloquea la inhibición dependiente de PD-1/PD-L1 de la señalización AP1-Luc en el Experimento 1

Anticuerpo	Concentración de ensayo Antagonista (M) de Anticuerpo a 150% de Experimento de Activación 1	Promedio de Emax. de ensayo Antagonista [%] @ 100nM de Experimento 1
H1M7789N	N/A	135
H1M7799N	2,97E-08	183
H1M7800N	1,65E-08	182
H2aM7779N	8,92E-09	214
H2aM7780N	6,52E-09	228
H2aM7781N	6,70E-09	230
H2aM7782N	9,96E-09	215
H2aM7787N	1,38E-08	215
H2aM7788N	4,72E-09	189
H2aM7790N	5,24E-09	234

H2aM7791N	N/A	103
H2aM7794N	4,09E-08	170
H2aM7795N	N/A	109
H2aM7796N	N/A	121
H2aM7798N	7,99E-10	239
H4H9019P	1,79E-08	180
H4xH9034P	2,62E-09	202
H4xH9035P	1,20E-09	227
H4xH9037P	2,82E-09	195
H4xH9045P	2,23E-08	176
H4xH9048P2	N/A	138
H4H9057P2	2,68E-08	212
H4H9068P2	N/A	102
H4xH9119P2	1,11E-08	163
H4xH9120P2	1,10E-08	166
H4xH9128P2	3,99E-09	187
H4xH9135P2	1,55E-09	193
H4xH9145P2	2,40E-09	185
H4xH8992P	5,32E-09	178
H4xH8999P	8,63E-10	217
H4H7798N	1,54E-09	202
Control de isotipo mIgG1	N/A	92
Control de isotipo migG2a	N/A	91
Control de isotipo hIgG4	N/A	94

N/A = no aplicable debido a que las concentraciones probadas de estos anticuerpos no activan el 150%

Tabla 23: anticuerpo anti-PD1 que bloquea la inhibición dependiente de PD-1/PD-L1 de la señalización AP1-Luc en el Experimento 2

Anticuerpo	Concentración de ensayo Antagonista (M) de Anticuerpo a 150% de Experimento de Activación 2	Promedio de E_{max} de ensayo Antagonista [%] @ 100nM Experimento 2
H4H7795N2	N/A	110
H4H7798N	1,59E-10	343
H4H9008P	9,84E-08	150
H4H9048P	N/A	134
Control de isotipo hIgG4	N/A	98

N/A = no aplicable debido a que las concentraciones probadas de estos anticuerpos no activan el 150%

[00231] Tal como se muestra en la Tabla 22, 25 de los 31 anticuerpos anti-PD-1 de la invención ensayados bloquearon la inhibición de PD-1/PD-L1 con valores E_{max} que van de

239 a 163. Seis de los 31 anticuerpos anti-PD-1 de la invención no demostraron bloqueo sustancial de la interacción PD1/PD-L1 cuando se probaron en este ensayo.

[00232] Tal como se muestra en la Tabla 23, 2 de los 4 anticuerpos anti-PD-1 de la invención ensayados bloquearon la inhibición de PD-1/PD-L1 con los valores de $E_{\max}$ de 150 y 343%, respectivamente. 2 de los 4 anticuerpos anti-PD-1 de la invención no demostraron bloqueo sustancial de la interacción de PD1/PD-L1 cuando se probaron en este ensayo.

Ejemplo 9: eficacia in vivo de anticuerpos anti-PD-1

[00233] Para determinar el efecto de un número selecto de anticuerpos anti-PD-1 de la invención en un modelo in vivo relevante, se llevaron a cabo tres estudios de crecimiento tumoral MC38.ova, que implican la inyección subcutánea de células tumorales e iniciado en diferentes días, en ratones que eran homocigotas para la expresión del dominio extracelular de PD-1 humano en lugar del dominio extracelular de PD-1 de ratón (PD-1 Humin de ratones) en un 75% de C57/B16/25% de 129 cepas de fondo.

[00234] Para los estudios, los ratones se dividieron uniformemente de acuerdo con el peso corporal en 5 grupos de tratamiento o de control para el Estudio 1 (5 ratones por grupo), 8 grupos de tratamiento o de control para el Estudio 2 (5 ratones por grupo) y 5 grupos de tratamiento o de control para el Estudio 3 (7 ratones por grupo). En el día 0, los ratones se anestesiaron por inhalación de isoflurano y luego se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho con 5×10^5 células MC38.ova en suspensión de 100 uL de DMEM para el Estudio 1 o 1×10^6 células MC38.ova en suspensión de 100 uL de DMEM para el Estudio 2 y Estudio 3. Para el Estudio 1, los grupos de tratamiento se inyectaron intraperitonealmente con 200 ug de cualquiera de uno de los tres anticuerpos anti-PD-1 de la invención, o un anticuerpo de control de isotipo con especificidad irrelevante en los días 3, 7, 10, 14 y 17 del experimento, mientras que un grupo de ratones se dejó sin tratar. Para el Estudio 2, los grupos de tratamiento se inyectaron intraperitonealmente con cualquiera de uno de los tres anticuerpos anti-PD-1 de la invención a 10 mg/kg o 5 mg/kg por/dosis, un anticuerpo de la invención (H4H7795N2) a 10 mg/kg por dosis, o un anticuerpo de control de isotipo con especificidad irrelevante a 10 mg/kg en los días 3, 7, 10, 14 y 17 del experimento. Para Estudio 3, los grupos de tratamiento se inyectaron intraperitonealmente con uno de los dos anticuerpos anti-PD-1 de la invención a 5 mg/kg o 2,5 mg/kg por/dosis, o un anticuerpo de control de isotipo con especificidad irrelevante en 5 mg/kg en los días 3, 7, 10, 14 y 17 del experimento. La dosificación experimental y el protocolo de tratamiento para los grupos de ratones se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: dosificación experimental y protocolo de tratamiento para grupos de ratones

Estudio #	Muestras ensayadas	Cantidad de dosificación en cada punto del tiempo de dosificación	Intervalo de dosificación
1	Control de isotipo	200 ug	Días 3, 7, 10, 14, 17
	Sin tratamiento	N/A	N/A

	H4H7798N	200 ug	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7795N2	200 ug	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	200 ug	Días 3, 7, 10, 14, 17
2	Control de isotipo	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7795N2	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9048P2	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9048P2	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
3	Control de isotipo	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H7798N	2,5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H4H9008P	2,5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17

[00235] Para los estudios, se registraron volúmenes medios de tumor determinados por mediciones del calibre y el porcentaje de supervivencia en el día 14 o 17 y el día 23 o 24 de cada experimento para cada grupo de tratamiento. Además, también se evaluó el número de ratones libres de tumor al final del estudio (día 42 para el Estudio 1 y día 31 para el Estudio 2 y Estudio 3). Los resultados, expresados como volumen medio del tumor (mm³) ($\pm$ SD), el porcentaje de supervivencia y el número de ratones libres de tumor se muestran en la Tabla 23 para el Estudio 1, la Tabla 3 para el Estudio 2 y la Tabla 4 para el Estudio 3.

Tabla 25: volumen medio del tumor, porcentaje de supervivencia y número de ratones libres de tumor en cada grupo de tratamiento del Estudio 1 del tumor in vivo

Grupo de tratamiento (n=5)	Volumen del tumor, mm ³ promedio ($\pm$ SD)		Supervivencia, %		Ratones libres de tumor
	Día 17	Día 23	Día 17	Día 23	Día 42
	200 ug/ratón	200 ug/ratón	200 ug/ratón	200 ug/ratón	200 ug/ratón
Sin tratamiento	189 ($\pm$ 110)	554 ($\pm$ 317)	100%	100%	1/5(20%)
Control de isotipo	86 ($\pm$ 114)	515 ($\pm$ 859)	100%	60%	2/5 (40%)
H4H7798N	0 (0)	0 (0)	100%	100%	5/5 (100%)
H4H9008P	14 ($\pm$ 19)	205 ($\pm$ 312)	100%	100%	3/5 (60%)
H4H7795N2	89 ($\pm$ 176)	445 ($\pm$ 889)	100%	80%	3/5 (60%)

[00236] Tal como se muestra en la Tabla 25 para el Estudio 1, los ratones tratados con un anticuerpo de la invención, H4H7798N no desarrollaron ningún tumor detectable durante el curso del estudio. Los ratones tratados con H4H9008P exhibieron un volumen tumoral reducido sostenido en comparación con los controles en los días 17 y 24 del

estudio con 3 de los 5 ratones o 4 de los 5 ratones que están libres de tumor al final del experimento, respectivamente. En contraste, el tratamiento con uno de los anticuerpos anti-PD1, H4H7795N2, no demostró una eficacia significativa en la reducción de volumen del tumor en este estudio, en comparación con los controles. Durante el día 23 del estudio, 1 de cada 5 ratones murieron en el grupo H4H7795N2, y 2 de cada 5 ratones murieron en el grupo de tratamiento de control de isotipo. En el grupo sin tratamiento y el grupo de control de isotipo algunos ratones mostraron una regresión espontánea de tumores (1 de 5 ratones y 2 de 5 ratones, respectivamente).

Tabla 26: volumen medio del tumor, porcentaje de supervivencia y número de ratones libres de tumor en cada grupo de tratamiento del Estudio 2 del tumor in vivo

Grupo de tratamiento (n:5)	Volumen del tumor, mm ³ promedio (±SD)				Supervivencia, %				Ratones libres de tumor	
	Días 17		Día 24		Día 17		Día 24		Día 31	
	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
Control de isotipo	N1A	449 (±434)	N1A	824 (±858)	N1A	100%	N1A	60%	N1A	115 (20%)
H4H77994	17 (±38)	0(0)	104 (-1233)	0(0)	100%	100%	100%	100%	4/5 (80%)	5151 (100%)
H4H9008P	91 (±204)	12 (±28)	228 (±509)	96 (±215)	100%	100%	80%	100%	4/5 (80%)	415 (80%)
H4H9048P2	94 (±160)	10 (±21)	328 (±559)	67 (±150)	100%	100%	80%	100%	3/5 (60%)	415 (80%)
H4H7795N2	N1A	124 (±209)	N1A	359 (±657)	N1A	100%	N1A	80%	N1A	2/5 (40%)

[00237] Tal como se muestra en la Tabla 26 para el Estudio 2, los ratones tratados con un anticuerpo de la invención, H4H7798N a 10 mg/kg no desarrollaron tumores detectables durante el curso del estudio. Los grupos de ratones tratados con 10 mg/kg de cualquiera de H4H9008P o H4H9048P2 exhibieron volumen del tumor sustancialmente reducido en comparación con los controles en los días 17 y 24 del estudio. Cuatro de 5 ratones en cada grupo tratado con 10 mg/kg de cualquiera de H4H9008P o H4H9048P2 estaban libres de tumor en el día 31, mientras que en el grupo de tratamiento de control de isotipo sólo 1 de cada 5 animales estaba libre de tumor como resultado de la regresión espontánea del tumor. Un anticuerpo ensayado a 10 mg/kg, H4H7795N2, demostró volumen sustancialmente reducido del tumor en comparación con los controles en el día 17 y 24 del estudio, pero este anticuerpo fue el anticuerpo anti-PD1 menos efectivo con sólo 2 de 5 ratones supervivientes al final del experimento.

[00238] Se observó una respuesta dependiente de dosis en la supresión tumoral a las dosis ensayadas (5 mg/kg y 10 mg/kg) en los grupos tratados con H4H7798N, H4H9008P y H4H9048P2. H4H7798N o terapia H4H9008P a 5 mg/kg fue menos efectiva, con 4 de 5 ratones libres de tumor al final del experimento en el día 21, mientras que 5 de 5 ratones

permanecieron libres de tumor en ambos grupos de 10 mg/kg de dosis de H4H7798N y H4H9008P.

[00239] La prueba de Dunett en 2 vías de comparaciones múltiples ANOVA revelaron que las diferencias en el crecimiento tumoral entre el grupo tratado con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg como referencia y los grupos tratados a 10 mg/kg, ya sea con H4H7798N, H4H9008P o H4H9048P2 fueron estadísticamente significativos con valor de $p < 0,005$. Las diferencias en el crecimiento tumoral entre el grupo tratado con anticuerpo de control de isotipo a 10 mg/kg como referencia y los grupos tratados a 5 mg/kg, ya sea con H4H7798N, H4H9008P o H4H9048P2 también fueron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,05$.

Tabla 27: volumen medio del tumor, porcentaje de supervivencia y número de ratones libres de tumor en cada grupo de tratamiento del Estudio 3 del tumor in vivo

Grupo de tratamiento (n=7)	Volumen del tumor, mm3 promedio ($\pm$ SD)				Supervivencia, %				Ratones libres de tumor	
	Días 14		Día 21		Día 14		Día 21		Día 31	
	2,5 mg/kg	5 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg	2,5 mg/kg	5 mg/kg
Control de isotipo	N/A	94($\pm$ 44)	N/A	405 ($\pm$ 326)	N/A	100%	N/A	86%	N/A	0/7 (0%)
H4H7798N	0(0)	0(0)	19 ($\pm$ 51)	13 ($\pm$ 35)	100%	100%	100%	100%	6/7 (86%)	6/7 (86%)
H4H9008P	41 ($\pm$ 68)	7 ($\pm$ 20)	87 ($\pm$ 123)	16 ($\pm$ 42)	100%	100%	100%	100%	4/7 (57%)	6/7 (86%)

[00240] Tal como se muestra en la Tabla 27 para el Estudio 3, 6 de 7 ratones tratados con un anticuerpo de la invención, H4H7798N, u otro anticuerpo de la invención, H4H9008P, a 5 mg/kg estaban libres de tumor al final del experimento, mientras que no hubo animales libres de tumor en el grupo de control de isotipo. Un ratón portador de un tumor en el grupo de control de IgG4 murió el día 17 después de la implantación. Sólo 4 de 7 ratones tratados con H4H9008P a 2,5 mg/kg de dosis se mantuvieron libres de tumor al final del experimento. La diferencia en los volúmenes tumorales en el día 21 entre los anticuerpos anti-PD-1 ensayados y un grupo de control de isotipo fue estadísticamente significativo según lo determinado por ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dumett post-ensayo con $p < 0,01$. Los cuatro anticuerpos anti-PD-1 fueron igualmente más eficaces en la dosis de 5 mg/kg que en la dosis de 2,5 mg/kg.

Ejemplo 10: efectos antitumorales de una combinación de un anticuerpo anti-PD-1 y un antagonista de VEGF en un modelo de tumor de ratón de tratamiento temprano

[00241] Un modelo de tratamiento de tumor temprano se desarrolló para probar la eficacia de una combinación de un anticuerpo anti-PD-1 y un antagonista de VEGF. En este modelo, la terapia de combinación se administra poco después de la implantación del

tumor. El experimento también utilizó un anticuerpo anti-PD-L1 solo y en combinación con el antagonista de VEGF. El anticuerpo anti-PD-1 utilizado en este experimento fue clon de PD-1 anti-ratón “RPMI-14” con IgG2b de rata (Bio X Cell, West Lebanon, NH). El antagonista de VEGF utilizado en este experimento fue aflibercept (una molécula quimérica basada en receptores VEGF, también conocida como “trampa de VEGF” o “VEGFR1R2-FcAC1 (a)”, cuya descripción completa se proporciona en el presente documento). El anticuerpo anti-PD-L1 utilizado en este experimento fue un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 con secuencias de V_H/V_L de anticuerpo “YW243.55S70”, de acuerdo con US20100203056A1 (Genentech, Inc.), con IgG2a de ratón y fue reactivo de forma cruzada con el PD-L1 de ratón.

[00242] Para este modelo experimental, se implantaron subcutáneamente $1,0 \times 10^6$ células tumorales de colon-26 en ratones BALB/c en el día 0. A partir del día 3, antes del establecimiento de los tumores medibles, los ratones se trataron con una de las mono- o terapias combinadas, o combinación de control, tal como se establece en la Tabla 28.

Tabla 28: dosificación experimental y grupos de tratamiento

Grupo de Tratamiento	Primer Agente	Segundo Agente
Combinación de control	Control de isotipo de IgG2a (250 µg, IP)	Control de hFc (250 µg, SC)
Trampa de VEGF solo	Control de isotipo de IgG2a (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)
Anti-PD-1 solo	Anti-PD-1 mAb RPMI-14 (250 µg, IP)	control de hFc (250 µg, SC)
Anti-PD-L1 solo	Anti-PD-L1 mAb (250 µg, IP)	control de hFc (250 µg, SC)
Trampa de VEGF + anti-PD-1	Anti-PD-1 mAb RPMI-14 (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)
Trampa de VEGF + anti-PD-L1	Anti-PD-L1 mAb (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)

[00243] Las diversas terapias se administraron a cinco puntos de tiempo diferentes durante un período de dos semanas (es decir, las inyecciones en el Día 3, Día 6, Día 10, Día 13 y Día 19).

[00244] Los animales en cada grupo de tratamiento se evaluaron en términos de la incidencia de tumores, el volumen del tumor, tiempo medio de supervivencia y el número de animales libres de tumor en el Día 50. La medida del crecimiento tumoral se resume en la Figura 2 (curvas de crecimiento tumoral) y la Figura 3 (volumen del tumor en el día 28). Los resultados también se resumen en la Tabla 29.

Tabla 29: ratones libres de tumor en grupos de tratamiento

Grupo de Tratamiento	Número de animales libres de tumor al Día 50
Combinación de control	0/10

Trampa de VEGF solo	3/10
Anti-PD-1 solo	4/10
Anti-PD-L1 solo	5/10
Trampa de VEGF + anti-PD-1	7/10
Trampa de VEGF + anti-PD-L1	9/10

[00245] El crecimiento tumoral se redujo sustancialmente en los animales tratados con la combinación de Trampa de VEGF + anticuerpo anti-PD-1 en comparación con los regímenes de tratamiento que implican cualquier agente terapéutico solo (véase las Figuras 2 y 3). Además, la supervivencia se incrementó sustancialmente en el grupo Trampa de VEGF + anticuerpo anti-PD-1, con 70% de animales que sobrevivían por lo menos 50 días después de la implantación del tumor. Por el contrario, para los grupos de monoterapia de anti-PD-1 y Trampa de VEGF, la supervivencia al Día 50 fue sólo del 40% y 30%, respectivamente (véase la Figura 3 y Tabla 29).

Ejemplo 11: estudio de ensayo clínico de la dosificación de repetición con anticuerpo anti-PD-1 como terapia única y en combinación con otras terapias contra el cáncer en pacientes con neoplasias malignas avanzadas

[00246] Se trata de un estudio de escalada de dosis de anticuerpo anti-PD-1, solo o en combinación con radioterapia, ciclofosfamida, o ambos, en pacientes con neoplasias avanzadas. Ejemplos de anticuerpo anti-PD-1 (“mAb”) utilizado en este ejemplo comprende HCVR de la SEC. ID. NO: 162 y LCVR de la SEC. ID. NO: 170.

Objetivos del estudio

[00247] El objetivo principal del estudio es caracterizar la seguridad, tolerabilidad, DLT de mAb administrado IV como monoterapia, o en combinación con radiación dirigida (con la intención de que esto sirva como un inmuno-estimulador, en lugar de principalmente terapia ablativa de tumor), ciclofosfamida de dosis baja (una terapia que demuestra inhibir las respuestas de células T reguladoras), o ambos, en pacientes con neoplasias malignas avanzadas.

[00248] Los objetivos secundarios del estudio son: (1) determinar una dosis de 2 fases recomendada (RP2D) de mAb como monoterapia y en combinación con otras terapias contra el cáncer (radiación dirigida, dosis bajas de ciclofosfamida, o ambas); (2) describir la actividad antitumoral preliminar de mAb, solo y con cada pareja o parejas de combinación; (3) caracterizar la PK de mAb como monoterapia y en combinación con otras terapias anti-cáncer (radiación dirigida, ciclofosfamida de dosis baja, o ambas); y (4) evaluar la inmunogenicidad de mAb.

Diseño del estudio

[00249] La seguridad se evaluó en cohortes de escalamiento de 3 + 3 dosis estándar separadas (en monoterapia, combinación con radioterapia, combinación con ciclofosfamida, y combinación con radioterapia y ciclofosfamida). La elección de la terapia de combinación con radiación, ciclofosfamida o ambas se basará en la evaluación del

investigador de la mejor opción de la terapia para un paciente individual en consulta con el patrocinador. Para ser inscrito en una cohorte de radioterapia, un paciente debe tener una lesión que puede irradiarse de forma segura y para la cual la radiación a las dosis paliativas limitadas contempladas sería considerada médicamente apropiada, y al menos una otra lesión adecuada para la evaluación de la respuesta. A un paciente se le permitirá participar sólo si está disponible un espacio en la cohorte para el tratamiento elegido.

[00250] Los pacientes se someterán a los procedimientos de exploración para determinar la elegibilidad dentro de los 28 días antes de la administración inicial de mAb. Tras la participación de pacientes en una cohorte de monoterapia de mAb, la participación de las cohortes posteriores será determinada por la ocurrencia de DLT en cohortes anteriores (es decir, sin DLT en una cohorte de 3 pacientes, o no más de 1 DLT en una cohorte más amplia de 6 pacientes), y la disponibilidad de lugares para pacientes. Los niveles de dosis de monoterapia previstas son 1, 3 o 10 mg/kg administrados IV cada 14 días (2 semanas).

[00251] Una vez que uno o ambos de los períodos de observación de DLT de cohorte de monoterapia de 1 mg/kg o 3 mg/kg de mAb se completan sin DLT en una cohorte de 3 pacientes o con no más de 1 DLT en una cohorte ampliada de 6 pacientes, los pacientes pueden participar en una cohorte combinanda de ciclofosfamida o radioterapia con mAb en ese nivel de dosis de monoterapia. Los pacientes pueden estar inscritos en una combinación de mAb + ciclofosfamida/cohorte de radioterapia una vez que los períodos de observación de DLT, tanto para la cohorte de ese nivel de dosis mAb + ciclofosfamida como la cohorte de ese nivel de dosis mAb + el mismo régimen de radioterapia se completan sin DLT en una cohorte de 3 pacientes, o no más de 1 DLT en una cohorte más amplia de 6 pacientes.

[00252] Una vez que el período de observación DLT cohorte de monoterapia de 3 mg/kg de mAb se completa sin DLT en una cohorte de 3 pacientes, o no más de 1 DLT en una cohorte más amplia de 6 pacientes, se puede inscribir también a 10 mg/kg de cohorte de monoterapia de mAb.

[00253] Las cohortes de monoterapia de 3 mg/kg y 10 mg/kg de mAb se inscribirán sólo después de que el número necesario de pacientes en la cohorte de dosis de monoterapia anterior (es decir, 1 mg/kg y 3 mg/kg, respectivamente) hayan pasado los 28 días del período de observación DLT sin una dosis máxima tolerada (MTD) que haya demostrado ese nivel de dosis. Una cohorte de tratamiento de combinación de 1 mg/kg de mAb se inscribirá sólo después de la finalización del período de observación de DLT para la cohorte de monoterapia de 1 mg/kg. Las cohortes de combinación que recibieron 3 mg/kg de mAb se inscribirán sólo cuando el número necesario de pacientes en las cohortes de combinación respectivas de 1 mg/kg de mAb hayan pasado por el período de observación de DLT sin demostrar MTD. Las cohortes de combinación triples que combinan mAb con ciclofosfamida y un régimen de radiación se inscribirán sólo cuando el número necesario de pacientes en ambas cohortes de combinación doble correspondientes a la de ese nivel de dosis hayan pasado por el período de observación de DLT sin que se demuestre MTD.

[00254] La Tabla 30 resume las cohortes de escalada de dosis en donde se inscribieron los pacientes.

Tabla 30: cohortes de escalada de dosis posibles

n	Cohorte de Tratamiento Asignado Posible
3-6	0,3 mg/kg mAb monoterapia (participan sólo si MTD < 1 mg/kg mAb)

3-6	1 mg/kg mAb monoterapia
3-6	3 mg/kg mAb monoterapia ^{a)}
3-6	10 mg/kg mAb monoterapia ^{b)}
3-6	1 mg/kg ^{a)} mAb + radioterapia (6 Gy x 5)
3-6	1 mg/kg ^{a)} mAb + radioterapia (9 Gy x 3)
3-6	3 mg/kg ^{b)} (o MTD) mAb + ciclofosfamida
3-6	3 mg/kg ^{b)} (o MTD) mAb + radioterapia (6 Gy x 5)
3-6	3 mg/kg ^{b)} (o MTD) mAb + radioterapia (9 Gy x 3)
3-6	3 mg/kg ^{b)} (o MTD) mAb + radioterapia (6 Gy x 5) + ciclofosfamida
3-6	3 mg/kg ^{b)} (o MTD) mAb + radioterapia (9 Gy x 3) + ciclofosfamida

[00255] Una DLT se define como cualquiera de los siguientes: una toxicidad no hematológica (por ejemplo, uveítis, o cualquier otro irAE), o una toxicidad hematológica (por ejemplo, neutropenia, trombocitopenia, neutropenia febril).

[00256] La dosis máxima tolerada (MTD) se define como la dosis más alta a la cual menos de un tercio de una cohorte ampliada de 6 pacientes experimentan DLT durante el primer ciclo de tratamiento. Por lo tanto, la MTD se define como el nivel de dosis inmediatamente por debajo del nivel en el que la dosificación se detiene debido a la aparición de 2 o más DLT en una cohorte ampliada de 6 pacientes. Si el aumento de la dosis no se detiene debido a la ocurrencia de DLT, se considera que no se ha determinado la MTD. Es posible que en este estudio no se pueda definir una MTD, ya sea para un grupo de monoterapia o para grupos individuales de combinación. Además, es posible que MTD de mAb puedan diferir entre monoterapia y cada régimen de tratamiento de combinación.

Duración del estudio

[00257] Los pacientes recibirán hasta 48 semanas de tratamiento, después de lo cual habrá un periodo de 24 semanas de seguimiento. Un paciente recibirá el tratamiento hasta que el período de tratamiento de 48 semanas esté completo, o hasta la progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable, revocación del consentimiento, o cumplimiento de otro criterio de revocación del estudio. Después de un mínimo de 24 semanas de tratamiento, los pacientes con respuestas completas confirmadas (CR) pueden optar por interrumpir el tratamiento y continuar con todas las evaluaciones de los estudios pertinentes (por ejemplo, evaluaciones de eficacia). Después de un mínimo de 24 semanas de tratamiento, los pacientes con evaluaciones sobre la carga tumoral de enfermedad estable (SD) o respuesta parcial (PR) que han permanecido inalteradas durante 3 evaluaciones sucesivas tumorales también pueden optar por interrumpir el tratamiento y continuar con todas las evaluaciones de los estudios pertinentes (por ejemplo, evaluaciones de eficacia).

Población de estudio

[00258] La población objetivo para este estudio consistió en pacientes con neoplasias malignas avanzadas que no son candidatos para la terapia estándar, dispuestos a someterse a la terapia estándar, o para los que no se espera ninguna terapia disponible que transmita beneficio clínico; y los pacientes con neoplasias malignas que son incurables y no han respondido o mostraron progresión del tumor a pesar de la terapia estándar.

[00259] Criterios de inclusión: un paciente debe cumplir con los siguientes requisitos para ser elegido para su inclusión en el estudio: (1) que demuestre progresión de un tumor sólido sin opción terapéutica alternativa de atención estándar disponible; (2) al menos 1 lesión para la evaluación de la respuesta. Los pacientes asignados a la radioterapia requieren por lo menos una lesión adicional que puede ser irradiada de forma segura sin dañar las lesiones de referencia y para la cual la radiación a las dosis paliativas limitadas contempladas serían consideradas médicamente adecuadas; (3) estado de rendimiento del Grupo Oncológico Cooperativo Oriental (Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG)) 1; (4) tener más de 18 años de edad; (5) función hepática: a. total bilirrubina = 1,5x el límite superior de la normalidad (ULN; si el hígado hace metástasis = 3x ULN), b. transaminasas = 3x ULN (o = 5,0x ULN si el hígado hace metástasis), c. fosfatasa alcalina (ALP) = 2,5x ULN (o 5,0 x ULN, si el hígado hace metástasis); (6) función renal: creatinina sérica = 1,5 x ULN; (7) recuento de neutrófilos (ANC) = $1,5 \times 10^9/L$, c. recuento de plaquetas = $75 \times 10^9/L$; (8) la capacidad de proporcionar su consentimiento firmado; y (9) la capacidad y voluntad de cumplir con las visitas programadas, planes de tratamiento, pruebas de laboratorio y otros procedimientos relacionados con el estudio.

[00260] Criterios de exclusión: un paciente que cumple con cualquiera de los siguientes criterios será excluido del estudio: (1) evidencia reciente o en curso (dentro de 5 años) de la enfermedad autoinmune significativa que requiere tratamiento con tratamientos inmunosupresores sistémicos, lo que puede sugerir riesgo para irAEs; (2) tratamiento previo con un agente que bloquea la vía de PD-1/PD-L1; (3) tratamiento previo con otros agentes de modulación inmune dentro de menos de 4 semanas o 4 vidas medias, lo que sea mayor, antes de la primera dosis de mAb; (4) ejemplos de agentes inmunomoduladores que incluyen bloqueadores de CTLA-4, 4-1 BB (CD137), OX-40, vacunas terapéuticas o tratamientos de citoquinas; (5) metástasis cerebral no tratada (es) que se pueden considerar activas. Los pacientes con metástasis cerebrales tratadas previamente podrán participar siempre que sean estables (es decir, sin evidencia de progresión por imágenes durante al menos 4 semanas antes de la primera dosis del tratamiento de estudio, y cualquier síntoma neurológico que haya vuelto a la línea de base), y que no haya evidencia de nuevas o ampliación de metástasis cerebrales; (6) dosis de corticosteroides inmunosupresores (> 10 mg de prednisona al día o equivalente) dentro de las 4 semanas antes de la primera dosis de mAb; (7) trombosis venosa profunda, embolia pulmonar (incluyendo embolismo pulmonar asintomático identificado en las imágenes), o cualquier otro evento tromboembólico dentro de los 6 meses anteriores a la primera dosis de mAb; (8) infección activa que requiere tratamiento, incluyendo la infección conocida por el virus de la inmunodeficiencia humana, o una infección activa con la hepatitis B o el virus de la hepatitis C; (9) historial de neumonitis dentro de los últimos 5 años; (10) cualquier tratamiento antitumoral o en investigación dentro de los 30 días antes de la administración inicial de mAb; (11) historial de reacciones alérgicas documentadas o reacción de hipersensibilidad aguda atribuidas al tratamiento con terapias de anticuerpos en general, o a los agentes utilizados específicamente en el estudio; (12) alergia conocida a la doxiciclina o tetraciclina (precaución debido a la presencia de componentes traza en mAb); (13) lactancia materna; (14) prueba de embarazo de suero positiva; (15) historial dentro de los últimos 5 años de una neoplasia maligna invasiva distinta de la tratada en este estudio, con la excepción de resecado/ablación basal o carcinoma de células escamosas de la piel o carcinoma in situ del cuello uterino, u otros tumores locales considerados curados por el tratamiento local; (16) problemas psiquiátricos crónicos o agudos que, según la evaluación del investigador, hacen

que el paciente no se pueda elegir para la participación; y (17) actividad sexual continuada en hombres o mujeres en edad fértil que no están dispuestos a practicar métodos anticonceptivos adecuados durante el estudio.

Tratamientos del estudio

[00261] Se suministrará mAb como un líquido en viales estériles de un solo uso. Cada vial contendrá un volumen suficiente para extraer 10 ml de mAb a una concentración de 25 mg/mL. Las instrucciones sobre preparación de dosis se proporcionan en los manuales de referencia del estudio. Se suministrará mAb de forma ambulatoria como una infusión IV de 30 minutos. Cada dosis de paciente dependerá del peso corporal individual. La dosis de mAb debe ajustarse a cada ciclo para los cambios en el peso corporal de $\pm 10\%$. Se suministrará mAb solo y en combinación con la radiación y/o ciclofosfamida.

Monoterapia

[00262] Se suministrará mAb de forma ambulatoria por infusión IV durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas (es decir, los días 1, 15 ± 3 , 29 ± 3 y 43 ± 3 de un ciclo de 56 días). Los regímenes de monoterapia previstos para ser asignados pueden incluir: (i) la infusión IV de 1 mg/kg durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas; (ii) la infusión de 3 mg/kg durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas; (iii) la infusión de 10 mg/kg durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas; y (iv) la infusión de 0,3 mg/kg durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas (si se determina que MTD es inferior a 1 mg/kg).

Terapia combinada

[00263] La ciclofosfamida y la radioterapia concomitante se suministrarán a través de una prescripción médica y su uso, a las dosis, modificaciones de dosis, reducciones o retrasos, así como cualquier AE potencial que resulte de su uso, se les realizará un seguimiento junto con el de mAb.

[00264] **Administración conjunta de mAb y radiación:** se administrará mAb por infusión IV durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas en combinación con el tratamiento de radiación desde el día 8 al día 12. La combinación planificada de mAb y regímenes de radioterapia pueden incluir:

- infusión de 1 mg/kg de mAb durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas más 30 Gy de radioterapia (6 Gy x 5 veces/semana; dada 1 semana después de la primera dosis de mAb, preferentemente en días consecutivos)
- infusión de 1 mg/kg de mAb durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas más 27 Gy de radioterapia (9 Gy x 3 veces/semana; dada 1 semana después de la primera dosis de mAb, preferentemente no en días consecutivos)
- infusión de 3 mg/kg de mAb durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas más 30 Gy de radioterapia (6 Gy x 5 veces/semana; dada 1 semana después de la primera dosis de mAb, preferentemente en días consecutivos)

- infusión de 3 mg/kg de mAb durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas más 27 Gy de radioterapia (9 Gy x 3 veces/semana; dada 1 semana después de la primera dosis de mAb, preferentemente no en días consecutivos)

[00265] Los pacientes recibirán ya sea 30 Gy dadas como 5 fracciones de 6 Gy que se administran diariamente a partir de 1 semana después de la primera dosis de mAb, o 27 Gy dada como 3 fracciones de 9 Gy que se administran en días alternos a partir de 1 semana después de la primera dosis de mAb. La lesión seleccionada para la radiación debe ser una lesión que se pueda irradiar de manera segura con la irradiación focal sin afectar la o las lesiones de referencia, y para la cual la radiación a las dosis paliativas limitadas contempladas sería considerada médicamente adecuada. La dosis objetivo para un paciente se basa en la asignación de cohortes y debe cumplir con los requisitos de tejido normal, de acuerdo con la práctica de oncología de radiación estándar. El tratamiento en el régimen de dosificación especificado en el protocolo sólo se permite si se cumplen los criterios de tejido normal. Si los criterios de tejido normal no se pueden cumplir en cualquiera de los regímenes de radioterapia especificados en el protocolo, el paciente no se puede elegir para la inscripción en una cohorte de tratamiento de radiación de combinación en este estudio.

[00266] Administración conjunta de mAb y ciclofosfamida: se administrará mAb mediante infusión IV durante 30 minutos cada 14 días (2 semanas) durante 48 semanas en combinación con ciclofosfamida 200 mg/m² cada 14 días durante 4 dosis. Cada una de las 4 dosis de ciclofosfamida se puede administrar 1 día antes de cada una de las primera 4 dosis de mAb (días - 1, 14, 28 y 42 del primer ciclo de 56 días).

[00267] A pesar de que la ciclofosfamida se ha utilizado con éxito simultáneamente con otros fármacos, la tasa de metabolismo y la actividad leucopénica de la ciclofosfamida según se informa, se incrementan por la administración crónica de altas dosis de fenobarbital. El tratamiento con ciclofosfamida provoca una inhibición marcada y persistente de la actividad de la colinesterasa, potenciando así el efecto del cloruro de succinilcolina. La combinación planificada del régimen de mAb y de ciclofosfamida que se asignará es:

- ciclofosfamida 200 mg/m² cada 14 días (día - 1, 14, 28 y 42 del primer ciclo de 56 días) para un total de 4 dosis; más
- infusión de 3 mg/kg de mAb durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas (dosis de monoterapia proporcionada de 3 mg/kg < MTD; si 3 mg/kg > MTD, la dosis será de 1 mg/kg).

[00268] Administración conjunta de mAb, radiación y ciclofosfamida: La combinación planificada de un régimen de mAb, radiación y ciclofosfamida incluye:

- ciclofosfamida 200 mg/m² cada 14 días (día - 1, 14, 28 y 42 del primer ciclo de 56 días) para un total de 4 dosis; más
- 27 Gy de radioterapia (9 Gy x 3 veces/semana; dada 1 semana después de la primera dosis de mAb, preferentemente no en días consecutivos); o
30 Gy de radioterapia (6 Gy x 5 veces/semana; dada 1 semana después de la primera dosis de mAb, preferentemente en días consecutivos) más
- infusión de 3 mg/kg de mAb durante 30 minutos cada 14 días durante 48 semanas (dosis de monoterapia proporcionada de 3 mg/kg < MTD; si 3 mg/kg > MTD, la dosis será de 1 mg/kg)

Variables del estudio

[00269] Variables primarias: las variables de seguridad primarias incluyen incidencia de DLT, incidencia y gravedad de los eventos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) y hallazgos de laboratorio anormales a través de 48 semanas de tratamiento.

[00270] Variables secundarias: las variables secundarias principales incluyen lo siguiente:

- concentración sérica y farmacocinética (PK) de mAb
- actividades antitumorales evaluadas utilizando los criterios apropiados para la indicación:
 - o Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) criterios medidos mediante tomografía computarizada (TC) o imagen de resonancia magnética (MRI)
 - o Otros criterios de evaluación deberían utilizarse también para tumores específicos en los que las mediciones RECIST no son el estándar.
 - o Criterios de respuesta relacionados con la Inmunidad (RICR) aplican a las mediciones RECIST.

En todos los casos, irRC será la herramienta que rige para determinar la progresión de la enfermedad (PD), SD, CR o PR. Datos estándar RECIST también serán recogidos con fines informativos.

- anticuerpos anti-mAb

Procedimientos del estudio

[00271] Los siguientes procedimientos se llevarán a cabo en la exploración para los efectos para determinar la elegibilidad del estudio o la caracterización de la población de referencia: (i) suero β -HCG (resultado debe ser = 72 horas antes de la primera dosis); (ii) recopilación de material tumoral archivado: después de que un paciente haya dado su consentimiento informado, se le pedirá al paciente realizar las gestiones para proporcionar las muestras tumorales disponibles recogidas previamente; (iii) MRI cerebral: MRI cerebral se requiere en la exploración si no se lleva a cabo en los 60 días previos; y (iv) radiografía de tórax: La radiografía de tórax se requiere en la exploración si no se realiza en los 60 días previos.

[00272] Procedimientos de eficacia: Una CT o MRI para la evaluación del tumor se realizarán en la visita de exploración (dentro de los 28 días antes de la infusión) y durante cada ciclo (aproximadamente cada 8 semanas) el día 56 ± 3 , y cuando se sospecha de progresión de la enfermedad. Además, para los pacientes que no han progresado en el estudio, se realizará la evaluación del tumor para visitas de seguimiento 3, 5 y 7. Una vez que se ha hecho la elección de utilizar una CT de exploración o MRI, las evaluaciones posteriores se realizarán utilizando la misma modalidad.

[00273] La evaluación de la respuesta tumoral se realizará de acuerdo con los criterios de respuesta inmune relacionados (irRC; Nishino 2013). Las evaluaciones de acuerdo con los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) versión 1.1 (Eisenhauer 2009) también se llevarán a cabo como una exploración de apoyo; sin embargo, la determinación principal de progresión de la enfermedad para un paciente individual se hará de acuerdo con irRC. Las lesiones medibles seleccionadas como lesiones

objetivo para las evaluaciones RECIST también se incluirán como lesiones de referencia para las evaluaciones irRC.

[00274] Procedimientos de seguridad: Los signos vitales, incluyendo temperatura, presión arterial en reposo, pulso y respiración, serán recogidos. Cuando se programa en la misma visita que otros procedimientos, los signos vitales deben medirse antes de las evaluaciones clínicas de laboratorio, PK, o la recogida de muestras de exploración. Durante el ciclo 1, los signos vitales serán registrados en los días de tratamiento antes del tratamiento, al final de la infusión, cada 30 minutos durante las primeras 4 horas después de la infusión y a las 6 y 8 horas después de la administración del fármaco de estudio. En los ciclos posteriores, los signos vitales en los días de tratamiento serán evaluados y documentados antes de la infusión, cada 30 minutos durante las primeras 2 horas y después cada hora hasta 4 horas después de la administración del fármaco de estudio.

[00275] Un examen físico completo o limitado a fondo se realizará en las visitas. El examen físico completo incluirá el examen de la piel, cabeza, ojos, nariz, garganta, cuello, articulaciones, pulmones, corazón, pulso, abdomen (incluyendo el hígado y bazo), ganglios linfáticos y extremidades, así como un breve examen neurológico. La exploración física limitada incluirá pulmones, corazón, abdomen y piel.

[00276] Se realizará un ECG de 12 derivaciones estándar. Cualquier hallazgo en el ECG que se juzga por el investigador como un cambio clínicamente significativo (empeoramiento) comparado con el valor de referencia se considera un AE, registrado y monitoreado.

[00277] Los ensayos de seguridad inmunes constan de la titulación y patrón de factor reumatoide (RF), hormona estimulante de la tiroides (TSH), proteína C reactiva (PCR) y anticuerpos antinucleares (ANA). Si durante el curso del estudio, se observa un aumento de 4 veces o más del valor inicial en RF o ANA o niveles anormales de TSH o CRP, se pueden realizar de igual manera las siguientes pruebas: anticuerpos anti-ADN, anticuerpos anti-antígeno A del Síndrome de Sjögren (SSA) (Ro), anticuerpos anti-antígeno B del síndrome de Sjögren (SSB) (La), anticuerpos antitiroglobulina, anticuerpos anti-LKM, anticuerpos antifosfolípido, anticuerpo anti-células de islotes, anticuerpo anticitoplasma de neutrófilos, C3, C4, CH50. El tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y la relación normalizada internacional (INR) se analizarán por el laboratorio local del sitio.

Seguridad

[00278] Un evento adverso (AE) es cualquier incidencia médica adversa en un paciente que se le administra un fármaco de estudio que puede o no puede tener una relación causal con el fármaco de estudio. Por lo tanto, un AE es cualquier signo desfavorable y no intencionado (que incluye hallazgo anormal de laboratorio), síntoma o enfermedad que está asociado temporalmente con el uso de un fármaco de estudio, que se considere o no relacionado con el fármaco de estudio. Un AE también incluye cualquier empeoramiento (es decir, cualquier cambio clínicamente significativo en la frecuencia y/o intensidad) de una afección preexistente que está asociada temporalmente con el uso del fármaco de estudio. La progresión de la enfermedad maligna subyacente no será considerada como un AE si es claramente consistente con el patrón de progresión típica del cáncer subyacente (que incluye curso de tiempo, órganos afectados, etc.). Los síntomas clínicos de la progresión serán reportados como AE si el síntoma no se puede determinar como

exclusivamente debido a la progresión de la enfermedad maligna subyacente, o no encaja en los patrones de progresión de la enfermedad en estudio.

[00279] Un evento adverso grave (SAE) es cualquier incidencia médica perjudicial que a cualquier dosis produce la muerte, es potencialmente mortal, requiere hospitalización del paciente o prolongación de la hospitalización existente, produce una discapacidad/incapacidad persistente o significativa (interrupción sustancial de la propia capacidad para llevar a cabo las funciones normales de la vida), es una anomalía/defecto de nacimiento congénito.

[00280] Se registrará la información del paciente sobre la totalidad de AE y SAE.

Plan estadístico

[00281] La escalada de dosis de estudio se basa en un diseño tradicional de 3 + 3 con 3 a 6 pacientes asignados por nivel de dosis. El número exacto de pacientes incluidos en el estudio dependerá del número de DLT definido por el protocolo observado, y la necesidad de ampliar los niveles de dosis definidos en la actualidad, o abrir cohortes adicionales a niveles de dosis más bajas. Después de haberse producido la inscripción inicial requerida para la próxima cohorte en el aumento de la dosis, se ampliará la inscripción a cada una de las cohortes anteriores por debajo de MTD para el tratamiento (si no se expandió previamente durante el aumento) para un total de 6 pacientes.

[00282] Los datos se resumirán utilizando sólo estadística descriptiva. En general, los datos se pueden resumir mediante los niveles de dosis y combinaciones. Los resúmenes y análisis de seguridad se llevarán a cabo en el conjunto de análisis de seguridad (SAF). El análisis primario de seguridad se basará en AE emergentes del tratamiento (TEAE).

[00283] La presente invención no debe estar limitada en su alcance por las formas de realización específicas descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en el presente documento serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Tales modificaciones están destinadas a incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.