

ANTICUERPOS ANTI-PD-1 Y COMPOSICIONES

REFERENCIA CRUZADA A UNA SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente de Estados Unidos 62/236.341, presentada el 2 de octubre de 2015, cuya descripción se incorpora como
5 referencia a la presente memoria en su totalidad.

LISTA DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora a este documento como referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 28 de septiembre de 2016, se denomina
10 022675_WO052_SL.txt y tiene un tamaño de 65.000 bytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

PD-1, también conocida como Proteína de Muerte Celular Programada 1 y CD279, es un receptor de superficie celular de 268 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas. PD-1 es un miembro de la familia CD28 de reguladores de células T y se
15 expresa en células T, células B y macrófagos. Se une a los ligandos PD-L1 (también conocido como homólogo de B7) y PD-L2 (también conocido como B7-DC).

PD-1 es una proteína de membrana de tipo I cuya estructura incluye un dominio extracelular de IgV, una región transmembrana y una cola intracelular que contiene dos sitios de fosforilación. Conocida como una proteína de punto de control inmunitaria, PD-1 funciona
20 como un receptor inmunomodulador inducible, que juega un papel, p.ej., en la regulación negativa de las respuestas de las células T a la estimulación con antígenos.

PD-L1 es el ligando predominante para PD-1. La unión de PD-L1 a PD-1 inhibe la actividad de las células T, reduciendo la producción de citoquinas y suprimiendo la proliferación de las células T. Las células cancerosas que expresan PD-L1 pueden explotar
25 este mecanismo para inactivar la actividad antitumoral de las células T a través de la unión de PD-L1 al receptor PD-1.

En vista de sus propiedades reguladoras de la respuesta inmunitaria, PD-1 se ha investigado como un diana potencial para la inmunoterapia, incluyendo el tratamiento del cáncer y las enfermedades autoinmunes. Dos anticuerpos anti-PD-1, pembrolizumab y

nivolumab, han sido aprobados en los Estados Unidos y Europa para tratar ciertos cánceres.

En vista del papel crítico de PD-1 como inmunomodulador, existe la necesidad de terapias inmunológicas nuevas y mejoradas que se dirijan a PD-1 para tratar cánceres y ciertos trastornos del sistema inmunitario.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención se dirige a nuevos anticuerpos recombinantes que se dirigen a PD-1, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de estos anticuerpos, y al uso de anticuerpos y composiciones farmacéuticas para mejorar la inmunidad en un paciente, y para el tratamiento de cánceres. originado en tejidos tales como

10 piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas. En comparación con los tratamientos disponibles en la actualidad para tales cánceres, incluyendo tratamientos con anticuerpos, se contempla que los anticuerpos de la invención puedan proporcionar una respuesta clínica superior, ya sea solos o combinados con otro

15 agente terapéutico contra el cáncer, tal como un anticuerpo dirigido a otra proteína inmunitaria de punto de control.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo compite por la unión a PD-1 humana con, o se une al mismo epítipo de PD-1 humana como, cualquiera de los

20 anticuerpos 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 y 13112.15380.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende H-CDR1-3 que comprende las secuencias H-CDR1-3, respectivamente, del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382,

25 12760.15375 o 13112.15380.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un dominio variable de cadena pesada (VH) cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% (p.ej., al menos 92%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos el 99%) al dominio V_H del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376,

30 12777.15382, 12760.15375, o 13112.15380.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375, o 13112.15380.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene una cadena pesada (HC) que comprende la secuencia de aminoácidos de V_H del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375, o 13112.15380 y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 67.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende L-CDR1-3 que comprende las secuencias L-CDR1-3, respectivamente, del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 o 13112.15380.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un dominio variable de cadena ligera (V_L) cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% (p.ej., al menos 92%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos el 99%) al dominio V_L del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375, o 13112.15380.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de V_L del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375, o 13112.15380.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene una cadena ligera (LC) que comprende la secuencia de aminoácidos V_L de anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375, o 13112.15380 y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende cualquiera de las secuencias de cadena pesada descritas anteriormente y cualquiera de las secuencias de cadena ligera anteriores.

30 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR3 y L-CDR3 del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124,

12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 o 13112.15380.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375, o
5 13112.15380.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un V_H y un V_L cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos 90% (p.ej., al menos 92%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99%) a V_H y V_L , respectivamente, del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382,
10 12760.15375 o 13112.15380.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene un V_H y un V_L que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L , respectivamente, del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 o 13112.15380.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene una HC y una LC que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos HC y LC, respectivamente, del anticuerpo 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375, o 13112.15380.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 tiene (1) una HC que comprende la
20 secuencia de aminoácidos de V_H de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 y 13112.15380, y la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 67; y (2) una LC que comprende la secuencia de aminoácidos de V_L de ese anticuerpo seleccionado y la secuencia de
25 aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de:

a) SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22 y 23, respectivamente;

b) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 y 29, respectivamente;

c) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 y 35, respectivamente;

d) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente;

e) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46 y 47, respectivamente;

f) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 y 53, respectivamente;

5 g) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 y 59, respectivamente; o

h) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 y 65, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera que tiene las secuencias de aminoácidos de:

10 a) SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente;

b) SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente;

c) SEQ ID NO: 4 y 66, respectivamente;

d) SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente;

e) SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente;

15 f) SEQ ID NO: 10 y 11, respectivamente;

g) SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente;

h) SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente; o

i) SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 de la invención comprende:

20 a) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68;

b) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y 68;

25 c) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y 68;

d) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68;

e) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68;

5 f) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 68;

g) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68;

10 h) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68; o

i) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno de la invención comprende H-CDR1-3 y L-CDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18-20 y SEQ ID NO: 21-23, respectivamente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende un V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y un V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y una cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68.

15

20

La invención también proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo de PD-1 que comprende el residuo de aminoácido K131 (p.ej., anticuerpos 12819 y 12865 tales como los enumerados en las Tablas 1, 4-9 y 11-14). En algunas realizaciones, el epítipo comprende adicionalmente los residuos de aminoácido P130 y A132, y puede comprender adicionalmente residuos de aminoácido V64 y L128 (p.ej., un anticuerpo 12819). En algunas realizaciones, el epítipo comprende adicionalmente el residuo de aminoácido E136 (p.ej., un anticuerpo 12865).

25

La invención también proporciona un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo de PD-1 que comprende los residuos de aminoácido V44 y T145 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 13112 tales como los

30

enumerados en las Tablas 1, 4-7, 9 y 11-14).

En realizaciones concretas, el anticuerpo o porción se unen a un epítipo de PD-1 que comprende los residuos de aminoácido V64, L128, P130, K131 y A132 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819), los residuos de aminoácido K131 y E136 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12865), o los residuos de aminoácido V44 y T145 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 13112).

La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo de PD-1 que comprende los residuos de aminoácido 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819 o 12865). En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno se unen a un epítipo de PD-1 que comprende los residuos de aminoácido 56-64, 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción se unen a los residuos 69-75 (o un fragmento del mismo) de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819 o 12865). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción se unen a los residuos 136-140 (o un fragmento del mismo) de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819 o 12865). En algunas realizaciones, el anticuerpo o porción se unen a los residuos 69-75 (o un fragmento del mismo) y los residuos 136-140 (o un fragmento del mismo) de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819 o 12865).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención tienen al menos una de las siguientes propiedades:

- a) se une a PD-1 humana con una K_D de 750 pM o menos;
- b) se une a PD-1 de cinomolgo con una K_D de 7 nM o menos;
- c) se une a PD-1 de ratón con una K_D de 1 nM o menos;
- d) no se une a PD-1 de rata;
- e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo de sangre completa SEB;
- f) aumenta la secreción de IFN- γ en un ensayo de reacción mixta linfocitaria unidireccional;
- g) inhibe la interacción de PD-1 con PD-L1 en al menos 60% a una concentración de 10 g/ml en un análisis competitivo de citometría de flujo;

- h) bloquea la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 en al menos un 90% a una concentración de 10 µg/ml según se determina mediante análisis de interferometría Bio-Layer; e
- i) inhibe el crecimiento tumoral in vivo.

5 Los ejemplos de tal anticuerpo incluyen, sin limitación, un anticuerpo 12819 (que tiene las propiedades a-i); anticuerpos 12748, 12892 y 12777 (que tienen al menos las propiedades a, b, y e-h); anticuerpos 12865 y 12796 (que tienen al menos las propiedades a, b, e, f y h) y anticuerpos 12760 y 13112 (que tienen al menos las propiedades a, b, e, y f). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención tienen todas las propiedades mencionadas. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno tienen al menos las propiedades a, b y e-h. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno tienen al menos las propiedades a, b, e, f, y h. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno tiene al menos las propiedades a, b, e, y f.

15 A menos que se indique lo contrario, 12819, 12748, 12865, 12892, 12796, 12777, 12760 y 13112 se refieren a un grupo de anticuerpos que tienen las mismas seis CDR y que comparten los primeros cinco dígitos en sus designaciones numéricas de diez dígitos. Por ejemplo, 12748 incluye las variantes de anticuerpo 12748.15381 y 12748.16124, que tienen las mismas seis CDR (como se muestra en la Tabla 2). Se espera que cada grupo de anticuerpos comparta las mismas o sustancialmente las mismas propiedades biológicas.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención no compiten por la unión a PD-1 con pembrolizumab o nivolumab. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno de la invención no se unen al mismo epítipo que pembrolizumab o nivolumab; por ejemplo, el anticuerpo o la porción de la invención se unen a uno o más residuos en PD-1 que no se unen a pembrolizumab o nivolumab.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 La presente invención proporciona adicionalmente moléculas de ácido nucleico

aisladas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo anti-PD-1 como se describe en la presente memoria.

5 La presente invención también proporciona vectores que comprenden una molécula de ácido nucleico aislada de este tipo, en donde dicho vector comprende adicionalmente una secuencia de control de la expresión.

10 La presente invención también proporciona células anfitrionas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo PD-1 como se describe en la presente memoria.

15 La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria, que comprende proporcionar una célula anfitriona que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma de un anticuerpo anti-PD-1 como se describe en la presente memoria, cultivando dicha célula anfitriona en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o porción, y aislando el anticuerpo o porción resultante.

20 La presente invención también proporciona una molécula de unión biespecífica que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente memoria y la especificidad de unión de otro anticuerpo anti-PD-1 (p.ej., otro anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente memoria) o un anticuerpo que se dirige a una proteína diferente, tal como otra proteína inmunitaria de punto de control, un antígeno canceroso u otra molécula de superficie celular cuya actividad media en una enfermedad tal como el cáncer.

25 La presente invención también proporciona un método para mejorar la inmunidad en un paciente (p.ej., un paciente humano) que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo, una composición farmacéutica, o una molécula de unión biespecífica como se describe en la presente memoria.

La presente invención proporciona adicionalmente un método para tratar el cáncer en un paciente (p.ej., un paciente humano), que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo, una composición farmacéutica, o una molécula de unión biespecífica como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el cáncer se origina en un tejido seleccionado del grupo que consiste en piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas. El cáncer puede ser, por ejemplo, melanoma avanzado o metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales o linfoma de Hodgkin. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente administrar un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un agente anti-angiogénico, un inhibidor de tirosina quinasa, o un inhibidor de la ruta de PD-1.

La presente invención proporciona adicionalmente anticuerpos o porciones de unión a antígeno de la presente invención para su uso en los tratamientos mencionados anteriormente, y el uso de los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de la presente invención para la fabricación de medicamentos para los tratamientos mencionados anteriormente, es decir, el tratamiento de un ser humano que lo necesite para mejorar su sistema inmunitario, y el tratamiento de un ser humano con cáncer, tal como uno de los cánceres mencionados anteriormente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un producto de PCR que contiene las regiones V_H y V_L del anticuerpo anti-PD-1 AAS-12819 (que se muestra en color negro) clonadas en marco con la correspondiente cadena pesada humana IgG1-CH1-CH2-CH3 y fragmentos constantes lambda de la cadena ligera humana, respectivamente. Los sitios de restricción para esta clonación son Apal y Avrll. Los sitios de restricción Ascl y NheI se muestran entre los extremos 5' de V_H y V_L . El origen de replicación del plásmido se representa como pUCo y el gen que confiere resistencia a ampicilina se representa como AmpR.

La Figura 2 muestra una construcción de expresión con un promotor doble CMV insertado entre los extremos 5' de V_H y V_L utilizando sitios de restricción Ascl y NheI. Las secuencias V_H y V_L se representan en color negro, otros elementos genéticos anotados se representan en color blanco.

Las Figuras 3A-3C muestran gráficos de puntos de citometría de flujo representativos para (A) un clon de anticuerpo que se une específicamente a células transfectadas con PD-1 humana, (B) un clon que no se une específicamente a células CHO-S, y (C) un clon que no se une a ninguna de las poblaciones celulares utilizadas en el escrutinio.

5 La Figura 4 muestra la frecuencia de linfocitos que expresan PD-1 en seis donantes (D1-D6) antes y después de la estimulación con SEB (Enterotoxina B de *Staphylococcus*).

Las Figuras 5 A-1 muestran la titulación de anticuerpos anti-PD-1 candidatos en un ensayo con SEB.

10 Las Figuras 6A-H muestran la titulación de anticuerpos anti-PD-1 candidatos en un ensayo MLR unidireccional.

Las Figuras 7A-B muestran la unión de PD-L1 a células que expresan PD-1 en presencia de anticuerpos anti-PD-1.

La Figura 8 muestra una descripción general de los grupos de epítomos identificados (depósitos de epítomos) para anticuerpos anti-PD-1 sometidos a ensayo 12866.13188, 12807.13177, 12819.17149, 12865.17150, 12892.13195, 12777.15382, 12760.13169, 13112.15380, y nivolumab y análogos de pembrolizumab. Los anticuerpos conectados por líneas de color negro indican actividad de bloqueo cruzado. Los anticuerpos se agrupan de acuerdo con los patrones de competencia con otros anticuerpos anti-PD-1. Nivo: análogo de nivolumab; Pembro: análogo de pembrolizumab.

20 La Figura 9 (paneles AG) muestra la ubicación de epítomos de anticuerpos en la estructura de PD-1 humana (PDB 4ZQK y 2M2D). A) Viñeta del dominio extracelular (ECD) de PD-1 humana (residuos 33-150). Se ilustran la ubicación del GFCC y la hoja β de ABED y el bucle C'-D. B) Viñeta de PD-1 humana: complejo PD-L1 humano en los mismos ángulos de visión que en (A). C) Modelo molecular del epítomo de pembrolizumab que se muestra como un mapa de densidad con áreas más oscuras que representan regiones que median una unión más fuerte. Las zonas de color negro representan residuos de contacto encontrados mediante barrido de alanina. D) Modelo molecular del epítomo nivolumab representado como en (C). E) Modelo molecular del epítomo de anticuerpo 12819 representado como en (C). F) Modelo molecular del epítomo de anticuerpo 12865 representado como en (C).

La Figura 10 (paneles AD) muestra el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-PD-1 12819, 17149 o un vehículo sobre el crecimiento tumoral en cuatro modelos de tumor singénico. A) CT26 (cáncer de colon). B) C38 (cáncer de colon). C) ASB-XIV (cáncer de pulmón). D) Sa1N (fibrosarcoma). El área de color gris indica el período de tratamiento. Los
5 datos se presentan como medias $\pm$ ETM. * $P < 0,001$.

La Figura 11 muestra el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-PD-1 12819.17149, pembrolizumab (Keytruda®), o vehículo sobre el crecimiento tumoral de un modelo de tumor de xenoinjerto semi-humanizado, donde la línea celular de melanoma humano A375 se mezcló con células T humanas CD8+ y CD4+ purificadas antes de la
10 inoculación. El área de color gris indica el período de tratamiento. Los datos se presentan como medias $\pm$ ETM. * $P < 0,001$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos anti-PD-1 humanos que pueden usarse para mejorar el sistema inmunitario en un paciente humano, tal como un
15 paciente con cáncer. A menos que se indique lo contrario, según se utiliza en la presente memoria, "PD-1" se refiere a PD-1 humana. Una secuencia de polipéptido de PD-1 humana está disponible bajo el Número de Acceso Uniprot Q15116 (PDCD1_HUMAN), que se muestra aquí como SEQ ID NO: 1.

El término "anticuerpo" (Ab) o "inmunoglobulina" (Ig), según se utiliza en la presente
20 memoria, se refiere a un tetrámero que comprende dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por un dominio variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está compuesta por un dominio variable de cadena ligera (V_L) y una región
25 constante de cadena ligera (CL). Los dominios V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" (FR). Cada V_H y V_L está compuesto de tres CDR (H-CDR designa aquí una CDR de la cadena pesada, y L-CDR designa una CDR de la cadena ligera)
30 y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de los números de aminoácidos en la cadena pesada o ligera puede ser de acuerdo con las definiciones del IMGT® (Lefranc

et al, *Dev Comp Immunol* 27(1):55-77 (2003)); o las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 y 1991)); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); o Chothia et al., *Nature* 342:878-883 (1989).

5 El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se expresa a partir de una célula o línea celular que comprenden la secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo, donde dicha o dichas secuencias de nucleótidos no están asociadas de forma natural con la célula.

10 Los términos "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" se refieren a una proteína, polipéptido o anticuerpo que, en virtud de su origen o fuente de obtención (1), no están asociados con los componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo, (2) están libres de otras proteínas de la misma especie, (3) son expresados por una célula de una especie diferente y/o (4) no aparecen en la naturaleza. Por lo tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un
15 sistema celular diferente de la célula de la que se origina de manera natural se "aislará" de sus componentes asociados de forma natural. Una proteína también puede volverse sustancialmente libre de componentes asociados de forma natural mediante aislamiento, utilizando mecanismos de purificación de proteínas bien conocidos en la técnica.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "línea germinal" se refiere a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de genes de anticuerpos y segmentos de genes a medida que pasan de padres a hijos a través de células germinales. Las secuencias de la línea germinal se distinguen de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos en células B maduras, que han sido alteradas por eventos de recombinación e hipermutación durante el curso de la maduración de células B. Un anticuerpo que "utiliza" una secuencia de
25 línea germinal concreta tiene una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que se alinea con esa secuencia de nucleótidos de la línea germinal o con la secuencia de aminoácidos que especifica más estrechamente que con cualquier otra secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la línea germinal.

30 El término "afinidad" se refiere a una medida de la atracción entre un antígeno y un anticuerpo. La capacidad de atracción intrínseca del anticuerpo por el antígeno se expresa típicamente como la constante de equilibrio de afinidad de unión (K_D) de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un

antígeno cuando la K_D es <1 mM, preferiblemente <100 nM. Una constante de afinidad de unión K_D se puede medir, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore™) o Interferometría Bio-Capa, utilizando por ejemplo el sistema ProteOn™ XPR36 SPR de Bio-Rad o el sistema Octet™.

- 5 El término " k_{off} " se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno concreta. Una constante de velocidad de disociación k_{off} se puede medir mediante Interferometría Bio-Capa, por ejemplo, utilizando el sistema Octet™.

El término "epítipo", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una porción (determinante) de un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo o a una molécula relacionada tal como una molécula de unión biespecífica. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de azúcar y, en general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede ser "lineal" o "conformacional". En un epítipo lineal, todos los puntos de interacción entre una proteína (p.ej., un antígeno) y una molécula que interactúa (tal como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción ocurren a través de residuos de aminoácido en la proteína que están separados entre sí en la secuencia de aminoácidos primaria. Una vez que se determina un epítipo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos para ese epítipo utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede generar un anticuerpo para un epítipo lineal, por ejemplo, inmunizando un animal con un péptido que tiene los residuos de aminoácido del epítipo lineal. Se puede generar un anticuerpo para un epítipo conformacional, por ejemplo, inmunizando un animal con un mini dominio que contiene los residuos de aminoácido relevantes del epítipo conformacional. También se puede generar un anticuerpo para un epítipo particular, por ejemplo, inmunizando un animal con la molécula objetivo de interés o una porción relevante de la misma (p.ej., el ECD de PD-1), luego seleccionando la unión al epítipo.

Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítipo o compite por la unión con un anticuerpo anti-PD-1 de la invención utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación, ensayos competitivos, agrupamiento de epítipos y barrido de alanina. En algunas realizaciones, el anticuerpo de ensayo y un anticuerpo anti-PD-1 de la

invención se unen a al menos un residuo común (p.ej., al menos dos, tres, cuatro o cinco residuos comunes) en PD-1. En realizaciones adicionales, los residuos de contacto en PD-1 son completamente idénticos entre el anticuerpo de ensayo y el anticuerpo anti-PD-1 de la invención. En una realización, se permite que el anticuerpo anti-PD-1 de la invención se una a PD-1 en condiciones de saturación y a continuación se mide la capacidad del anticuerpo de ensayo para unirse a PD-1. Si el anticuerpo de ensayo puede unirse a PD-1 al mismo tiempo que el anticuerpo anti-PD-1 de referencia, en ese caso el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente que el anticuerpo de referencia anti-PD-1. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de unirse a PD-1 al mismo tiempo, en ese caso el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo, un epítipo superpuesto, o un epítipo que está muy cerca del epítipo unido al el anticuerpo anti-PD-1 de la invención. Este experimento se puede realizar utilizando ELISA, RIA, BIACORE™, Interferometría Bio-Capa o citometría de flujo. Para someter a ensayo si un anticuerpo anti-PD-1 compite de forma cruzada con otro anticuerpo anti-PD-1, se puede utilizar el método de competición descrito anteriormente en dos direcciones, es decir, determinar si el anticuerpo conocido bloquea el anticuerpo de ensayo y viceversa. Dichos experimentos de competición cruzada pueden realizarse, por ejemplo, utilizando un aparato IBIS MX96 SPR o el sistema Octet™.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere en su sentido más amplio a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más anticuerpos diferentes, típicamente un anticuerpo que es parcialmente de origen humano y parcialmente de origen no humano, es decir, obtenido en parte de un animal no humano, por ejemplo un ratón, rata u otro roedor, o un ave tal como un pollo. Los anticuerpos quiméricos se prefieren sobre los anticuerpos no humanos con el fin de reducir el riesgo de una respuesta anti-anticuerpo humano, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón en el caso de un anticuerpo murino. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico típico es aquel en el que las secuencias del dominio variable son murinas mientras que las secuencias de la región constante son humanas. En el caso de un anticuerpo quimérico, las partes no humanas pueden someterse a una alteración adicional para humanizar el anticuerpo. Los anticuerpos quiméricos descritos en la presente memoria tienen secuencias de dominio variable de pollo y secuencias de región constante humanas.

El término "humanizar" se refiere al hecho de que cuando un anticuerpo es total o parcialmente de origen no humano (p.ej., un anticuerpo murino o de pollo obtenido a partir de

la inmunización de ratones o pollos, respectivamente, con un antígeno de interés, o un anticuerpo quimérico basado en tal anticuerpo murino o de pollo), es posible reemplazar ciertos aminoácidos, en particular en las regiones marco y las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, con el fin de evitar o minimizar una respuesta inmunitaria en seres humanos. Aunque no es posible predecir exactamente la inmunogenicidad y por lo tanto la respuesta anti-anticuerpo humana de un anticuerpo concreto, los anticuerpos no humanos tienden a ser más inmunogénicos en seres humanos que los anticuerpos humanos. Se ha demostrado que los anticuerpos quiméricos, en los que se han reemplazados las regiones constantes foráneas (p.ej., de roedor o aviar) por secuencias de origen humano, son generalmente menos inmunogénicos que los anticuerpos de origen completamente foráneo, y la tendencia de los anticuerpos terapéuticos es hacia anticuerpos humanizados o completamente humanos. Los anticuerpos quiméricos u otros anticuerpos de origen no humano pueden ser humanizados por tanto para reducir el riesgo de respuesta anti-anticuerpo humana.

Para los anticuerpos quiméricos, la humanización típicamente implica la modificación de las regiones marco de las secuencias de dominio variable. Los residuos de aminoácido que forman parte de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con mayor frecuencia no se alterarán en relación con la humanización, aunque en ciertos casos puede ser deseable alterar los residuos de aminoácido de la CDR individual, por ejemplo para eliminar un sitio de glicosilación, un sitio de desamidación, un sitio de isomerización de aspartato o un residuo de cisteína o metionina no deseado. La glicosilación ligada a N se produce por la unión de una cadena de oligosacáridos a un residuo de asparragina en la secuencia tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación se puede lograr mutando el residuo Asn o Ser/Thr a un residuo diferente, preferiblemente por medio de una sustitución conservativa. La desamidación de residuos de asparragina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como el pH y la exposición superficial. Los residuos de asparragina son particularmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando está presente en la secuencia Asn-Gly, y en menor medida en otras secuencias dipeptídicas tales como Asn-Ala. Cuando dicho sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, está presente en una secuencia de CDR, puede ser deseable eliminar el sitio, típicamente mediante sustitución conservativa para eliminar uno de los residuos implicados.

Numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpo son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, la reseña de Almagro y Fransson, *Front Biosci.* 13:1619-1633 (2008). Un método comúnmente utilizado es el injerto de CDR, que para, por ejemplo, un anticuerpo quimérico derivado murino implica la identificación de contrapartes
5 del gen de la línea germinal humana de los genes del dominio variable murino y el injerto de las secuencias CDR murinas en este marco. La especificidad de la interacción de un anticuerpo con un antígeno diana reside principalmente en los residuos de aminoácido localizados en las seis CDR de la cadena pesada y ligera. Las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son, por lo tanto, mucho más variables entre los anticuerpos individuales
10 que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de un anticuerpo específico de origen natural, o más generalmente cualquier anticuerpo específico con una secuencia de aminoácidos determinada, por ejemplo, construyendo vectores de expresión que expresan
15 secuencias de CDR a partir del anticuerpo específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente. Como resultado, es posible "humanizar" un anticuerpo no humano y aún mantener sustancialmente la especificidad de unión y la afinidad del anticuerpo original. El injerto de CDR puede basarse en las definiciones de CDR de Kabat, aunque una publicación más reciente (Magdelaine-Beuzelin et al., *Crit Rev. Oncol Hematol.* 64:210-225
20 (2007)) ha sugerido que la definición de IMGT® (the international ImMunoGeneTics information system®, www.imgt.org) puede mejorar el resultado de la humanización (véase Lefranc et al., *Dev. Comp Immunol.*, 27:55-77 (2003)).

En algunos casos, el injerto de CDR puede reducir la especificidad y afinidad de unión, y por lo tanto la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado con CDR en
25 comparación con el anticuerpo parental a partir del que se obtienen las CDR. Se pueden introducir retromutaciones (a veces denominadas "reparación del marco") en posiciones seleccionadas del anticuerpo injertado con CDR, típicamente en las regiones marco, con el fin de restablecer la especificidad de unión y la afinidad del anticuerpo parental. La identificación de las posiciones para posibles retromutaciones se puede realizar utilizando la
30 información disponible en la bibliografía y en las bases de datos de anticuerpos. Los residuos de aminoácido que son candidatos para las retromutaciones son típicamente los que se encuentran en la superficie de una molécula de anticuerpo, mientras que los residuos que están ocultos o que tienen un bajo grado de exposición superficial no serán alterados

normalmente.

Una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y a la retromutación es la remodelación, en la que se retienen residuos no expuestos en la superficie de origen no humano, mientras que los residuos de la superficie se alteran a residuos humanos.

5 En ciertos casos, también puede ser deseable alterar uno o más residuos de aminoácido de la CDR para mejorar la afinidad de unión al epítipo diana. Esto se conoce como "maduración de afinidad" y puede realizarse opcionalmente en relación con la humanización, por ejemplo en situaciones donde la humanización de un anticuerpo conduce a reducción de la especificidad o de la afinidad de unión y no es posible mejorar
10 suficientemente la especificidad o la afinidad de unión solo mediante retromutaciones. Se conocen en la técnica diversos métodos de maduración por afinidad, por ejemplo el método de mutagénesis por saturación de barrido *in vitro* descrito por Burks et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:412-417 (1997), y el método de maduración por afinidad *in vitro* por etapas de Wu et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6037 - 6042 (1998).

15 El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), según se utiliza en la presente memoria, se refiere a una o más porciones o fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p.ej., PD-1 humana, o una porción del mismo). Se ha demostrado que ciertos fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unión al antígeno del
20 anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión a antígeno" incluyen (i) un fragmento Fab: un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} (p.ej., los fragmentos Fab 12819.17149 y 12865.17150 descritos a continuación); (ii) un fragmento $F(ab')_2$: un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L
25 y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada capaz de unirse específicamente a un antígeno. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes,
30 mediante un conector sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que los dominios V_L y V_H se unen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). También dentro de la invención existen moléculas de

unión a antígeno que comprenden un V_H y/o un V_L . En el caso de un V_H , la molécula puede comprender también uno o más de una región CH1, bisagra, CH2, o CH3. También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla se incluyan dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se incluyen otras formas de anticuerpos de

5 cadena sencilla, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, pero utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y la creación de dos sitios de unión a antígeno.

10 Las porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina de anticuerpos completos. Además, se pueden obtener anticuerpos, porciones de anticuerpos y moléculas de inmunoadherencia utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, como se describe en la presente

15 memoria.

La clase (isotipo) y la subclase de anticuerpos anti-PD-1 se pueden determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo se pueden determinar utilizando anticuerpos que son específicos para una clase y una subclase concretas de anticuerpo. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente.

20 La clase y la subclase pueden determinarse mediante ELISA, Transferencia Western y otras técnicas. Alternativamente, la clase y la subclase pueden determinarse secuenciando la totalidad o una parte de las regiones constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando

25 la clase y la subclase de los anticuerpos.

Cuando se hace referencia a residuos de aminoácido concretos en una posición determinada de una secuencia de anticuerpo, una indicación de, por ejemplo, "35S" se refiere a la posición y residuo, es decir, en este caso indica que está presente un residuo de serina (S) en la posición 35 de la secuencia. De forma similar, una indicación de, por

30 ejemplo, "13Q+35S" se refiere a los dos residuos en las posiciones respectivas.

A menos que se indique lo contrario, todos los números de residuos de aminoácido del anticuerpo a los que se hace referencia en esta descripción son aquellos bajo el

esquema de numeración IMGT®.

Anticuerpos anti-PD-1s

La presente invención proporciona anticuerpos dirigidos contra PD-1 y porciones de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos pueden ser quiméricos, con dominios variables derivados de pollos, y regiones constantes humanas, o pueden ser humanizados. Los anticuerpos descritos en la presente memoria son en particular anticuerpos humanizados.

Las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L (SEQ ID NO: 2 a 17) de ocho anticuerpos anti-PD-1 humanizados seleccionados de la invención se muestran más abajo en la Tabla 4 (Ejemplo 4). Como referencia, los SEQ ID NO. se proporcionan a continuación en la Tabla 1.

Los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente memoria pueden referirse a un número de 5 dígitos, p.ej., "12819", o a un número de 10 dígitos, por ejemplo, "12819.15384". Según se utiliza en la presente memoria, el número de 5 dígitos se refiere a todos los anticuerpos que tienen las secuencias de CDR1-3 de cadena pesada y ligera mostradas para ese número en la Tabla 2, mientras que el uso de un número de 10 dígitos se refiere a una variante humanizada concreta. Por ejemplo, 12819.15384 es una variante humanizada concreta que tiene las secuencias de CDR de un anticuerpo 12819 como se muestra en la Tabla 2. El número de 5 dígitos abarca, por ejemplo, anticuerpos que son idénticos a las variantes de 10 dígitos que se muestran a continuación en la Tabla 1, excepto algunos cambios en las FR (p. ej., que carecen de los residuos SY en el extremo N terminal de la cadena ligera madura, o que tienen residuos SS en lugar de SY). Estas modificaciones no cambian las propiedades funcionales (p. ej., unión a antígeno) de los anticuerpos.

Tabla 1 SEQ ID NO para las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanizados anti-PD-1

Anticuerpo	V _H	V _L
12819.15384	2	3
12748.15381	4	5
12748.16124	4	66

12865.15377	6	7
12892.15378	8	9
12796.15376	10	11
12777.15382	12	13
12760.15375	14	15
13112.15380	16	17

La Tabla 2 siguiente proporciona los SEQ ID NO para las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y ligera de los anticuerpos.

5 Tabla 2 SEQ ID NO para las secuencias de aminoácidos de CDR de anticuerpos anti-PD-1

Anticuerpo	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
12819	18	19	20	21	22	23
12748	24	25	26	27	28	29
12865	30	31	32	33	34	35
12892	36	37	38	39	40	41
12796	42	43	44	45	46	47
12777	48	49	50	51	52	53
12760	54	55	56	57	58	59
13112	60	61	62	63	64	65

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18-20, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

5 un anticuerpo cuya V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67;

un anticuerpo cuya L-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 -23, respectivamente;

10 un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

un anticuerpo cuya V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68;

15 un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 18-23, respectivamente;

un anticuerpo cuya V_H tiene al menos un 90% de secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y cuya V_L tiene una secuencia idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;

20 un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y

un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:

2 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24-26, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4;

5 un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67;

un anticuerpo cuya L-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 27-29, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66;

10 un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66;

un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68;

15 un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 24-29, respectivamente;

un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66;

20 un anticuerpo cuyo V_H comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y cuyo V_L comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66; y

un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 66 y SEQ ID NO: 68.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30-32, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que

es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67;

5 un anticuerpo cuya L-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 33-35, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

10 un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68;

un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30-35, respectivamente;

15 un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y

20 un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36-38, respectivamente;

25 un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

d) un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67;

un anticuerpo cuya L-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 39-41, respectivamente;

5 un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68;

10 un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36-41, respectivamente;

un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

15 un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y

un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 42-44, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;

25 un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;

un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67;

un anticuerpo cuya L-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 45-47, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

5 un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 68;

un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 42-47, respectivamente;

10 un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y

15 un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

20 un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 48-50, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

25 un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67;

un anticuerpo cuya L-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 51-53, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de
5 SEQ ID NO: 13 y 68;

un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 48-53, respectivamente;

un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica
10 en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; y

un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 54-56, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que
20 es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;

un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67;

un anticuerpo cuya L-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID
25 NO: 57-59, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68;

5 un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 54-59, respectivamente;

un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15;

10 un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y

un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en:

15 un anticuerpo cuya H-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-62, respectivamente;

un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena pesada (V_H) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;

20 un anticuerpo cuya cadena pesada (HC) comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67;

un anticuerpo cuya L-CDR1-3 comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 63-65, respectivamente;

25 un anticuerpo cuyo dominio variable de cadena ligera (V_L) tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

un anticuerpo cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

un anticuerpo cuya cadena ligera (LC) comprende las secuencias de aminoácidos de

SEQ ID NO: 17 y 68;

un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 60-65, respectivamente;

5 un anticuerpo cuyo V_H tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y cuyo V_L tiene una secuencia que es idéntica en al menos 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

un anticuerpo cuyo V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y cuyo V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;

10 un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67 y cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12819 (p.ej., anticuerpo 12819.15384).

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12748 (p.ej., anticuerpo 12748.15381 o anticuerpo 12748.16124) .

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12865 (p.ej., anticuerpo 12865.15377).

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12892 (p.ej., anticuerpo 12892.15378).

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12796 (p.ej., anticuerpo 12796.15376).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12777 (p.ej., anticuerpo 12777.15382).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 12760 (p.ej., anticuerpo 12760.15375).

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de un anticuerpo 13112 (p.ej., anticuerpo 13112.15380).

10 En otra realización, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo tiene un V_H y un V_L que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos 90% (p.ej., al menos 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) a la de V_H y V_L , respectivamente, de uno cualquiera de los anticuerpos 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 y 13112.15380.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo tiene un V_H y un V_L que comprenden las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L , respectivamente, de cualquiera de los anticuerpos 12819.15384, 12748.15381, 12748.16124, 12865.15377, 12892.15378, 12796.15376, 12777.15382, 12760.15375 y 13112.15380.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende las secuencias de aminoácidos H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de:

- 20
- a) SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22 y 23, respectivamente;
 - b) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28 y 29, respectivamente;
 - c) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 y 35, respectivamente;
 - d) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40 y 41, respectivamente;
 - e) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46 y 47, respectivamente;
 - 25 f) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52 y 53, respectivamente;
 - g) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58 y 59, respectivamente; o
 - h) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64 y 65, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno

del mismo comprende un V_H que es idéntico en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, y un V_L que es idéntico en 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, a las secuencias de aminoácidos de:

- a) SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente;
- 5 b) SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 4 y 66, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente;
- f) SEQ ID NO: 10 y 11, respectivamente;
- 10 g) SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente; o
- i) SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo comprende un V_H y un V_L que son las secuencias de aminoácidos de:

- 15 a) SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 4 y 5, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 4 y 66, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente;
- 20 f) SEQ ID NO: 10 y 11, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 14 y 15, respectivamente; o
- i) SEQ ID NO: 16 y 17, respectivamente.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende:

una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68;

una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y 68;

5 una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y 68;

una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68;

10 una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68;

una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y 68;

una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68;

15 una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68; o

una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende:

20 una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 68;

una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y 68;

25 una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 y 68;

una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y 68;

una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y 67 y una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y 68;

una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:

una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y 67 y
5 una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y 68;

una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y 67 y
una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y 68; o

una HC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y 67 y
una LC que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y 68.

10 En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno descritos en la presente memoria puede tener al menos una de las siguientes propiedades:

a) se une a PD-1 humana con una K_D de 750 pM o menos;

b) se une a PD-1 de cinomolgo con una K_D de 7 nM o menos;

15 c) se une a PD-1 de ratón con una K_D de 1 nM o menos;

d) no se une a PD-1 de rata;

e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo de sangre completa SEB;

f) aumenta la secreción de IFN- γ en un ensayo de reacción mixta linfocitaria unidireccional;

20 g) inhibe la interacción de PD-1 con PD-L1 en al menos 60% a una concentración de 10 μ g/ml en un ensayo competitivo de citometría de flujo;

h) bloquea la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 en al menos un 90% a una

concentración de 10 μ g/ml según se determina por análisis de interferometría Bio-Layer; e

25 i) inhibe el crecimiento tumoral in vivo.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de

unión a antígeno descritos en la presente memoria pueden unirse a PD-1 humana con una K_D de al menos 900, al menos 850, al menos 800, al menos 750, al menos 700, al menos 650, al menos 600, al menos 550, al menos 500, al menos 450, al menos 400, al menos 350, al menos 300, al menos 250, al menos 200, al menos 150, en al menos 100, al menos 50, al menos 40, al menos 30 o al menos 20 pM. En ciertas realizaciones, la K_D se determina
 5 utilizando resonancia de plasmón superficial. En realizaciones concretas, los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno se unen a PD-1 humana con una afinidad más alta que nivolumab, pembrolizumab, o ambos.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de
 10 unión a antígeno descritas en la presente memoria se pueden unir a PD-1 de cinomolgo (SEQ ID NO: 89) con una K_D de al menos 9000, al menos 8000, al menos 7000, al menos 6000, al menos 5000, al menos 4000, al menos 3000, al menos 2500, al menos 2000, al menos 1500, al menos 1000, al menos 900, al menos 800, al menos 700, al menos 600, al menos 500, al menos 400, al menos 300, al menos 200, al menos 100, al menos 75, al
 15 menos 50, al menos 25, al menos 20, al menos 15, al menos 10 o al menos 5 pM. En ciertas realizaciones, la K_D se determina utilizando resonancia de plasmón superficial.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de
 unión a antígeno descritas en la presente memoria se pueden unir a PD-1 de ratón (SEQ ID
 NO: 91) con una K_D de al menos 1000, al menos 950, al menos 900, o al menos 850 pM. En
 20 ciertas realizaciones, la K_D se determina utilizando resonancia de plasmón superficial.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de
 unión a antígeno descritas en la presente memoria puede inhibir la interacción de PD-1 con
 PD-L1 en al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al
 menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al
 25 menos 87%, al menos 88% , al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al
 menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al
 menos 99%, o 100% a una concentración de 10 μ g/ml en un análisis competitivo de
 citometría de flujo. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a
 antígeno pueden inhibir la interacción de PD-1 con PD-L1 en al menos 83%.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de
 30 unión a antígeno descritas en la presente memoria pueden bloquear la unión de PD-L1 y PD-
 L2 a PD-1 en al menos 20%, al menos 30%, a al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%,

al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% a una concentración de 10 µg/ml según se determina mediante análisis de Interferometría Bio-Layer. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 o las porciones de unión a antígeno bloquean la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1 en al menos 90%.

En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno descritos en la presente pueden competir o competir de manera cruzada por la unión a PD-1 con los anticuerpos 12865, 12892 y 12777 (p.ej., anticuerpos 12865.15377, 12892.15378 y 12777.15382). En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno descritas en la presente memoria pueden competir o competir de manera cruzada por la unión a PD-1 con un anticuerpo 12819 (p.ej., anticuerpo 12819.15384). En algunas realizaciones, cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno descritas en la presente memoria pueden competir o competir de manera cruzada por la unión a PD-1 con los anticuerpos 12760 y 13112 (p.ej., anticuerpos 12760.15375 y 13112.15380).

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo de PD-1 que incluye al menos uno (p.ej., al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco) de los siguientes residuos de SEQ ID NO: 1: V44, V64, L128, P130, K131, A132, E136 y T145. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno se unen a un epítipo de PD-1 que incluye los residuos V64, L128, P130, K131 y A132 de SEQ ID NO: 1 (tal como un anticuerpo 12819, por ejemplo, el anticuerpo 12819.15384). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno se unen a un epítipo de PD-1 que incluye los residuos K131 y E136 de SEQ ID NO: 1 (tal como un anticuerpo 12865, por ejemplo, el anticuerpo 12865.15377). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno se unen a un epítipo de PD-1 que incluye los residuos V44 y T145 de SEQ ID NO: 1 (tal como un anticuerpo 13112, por ejemplo, el anticuerpo 13112.15380).

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo de PD-1 que comprende los residuos 56-64, 69-90 y/o 122-140 de SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno se unen a un epítipo de PD-1 que comprende los residuos 69-90 y 122-

140 de SEQ ID NO: 1 (tales como los anticuerpos 12819 y 12865, por ejemplo, los anticuerpos 12819.15384 y 12865.15377). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno se unen a un epítipo de PD-1 que comprende los residuos 56-64, 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12819). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno se unen a un epítipo de PD-1 que comprende los residuos 69-90 y 122-140 de SEQ ID NO: 1 (p.ej., un anticuerpo 12865). En algunas realizaciones, el anticuerpo o porción se unen a los residuos 69-75 (o un fragmento del mismo, tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis fragmentos de residuos), de SEQ ID NO: 1 (tal como los anticuerpos 12819 y 12865, por ejemplo, los anticuerpos 12819.15384 y 12865.15377). En algunas realizaciones, el anticuerpo o porción se unen a los residuos 136-140 (o un fragmento del mismo, tal como uno, dos, tres o cuatro fragmentos de residuos) de SEQ ID NO: 1 (tales como los anticuerpos 12819 y 12865, p.ej., los anticuerpos 12819.15384 y 12865.15377). En algunas realizaciones, el anticuerpo o porción se unen a los residuos 69-75 (o un fragmento del mismo) y los residuos 136-140 (o un fragmento del mismo) de SEQ ID NO: 1 (tales como los anticuerpos 12819 y 12865, p.ej., los anticuerpos 12819.15384 y 12865.15377). También se contempla un epítipo con cualquier combinación de los residuos anteriores.

En algunas realizaciones, se puede utilizar como inmunógeno una secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo de PD-1 como se describe en la presente memoria (p.ej., administrado a un animal o en forma de antígeno para escrutar bibliotecas de anticuerpos) para generar o identificar anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de los mismos que se unen a dicho epítipo.

La clase de un anticuerpo anti-PD-1 obtenido mediante los métodos descritos en la presente memoria se puede reemplazar o cambiar por otra clase o subclase. En un aspecto de la invención, una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se aísla utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica de manera que no incluya secuencias de ácidos nucleicos que codifican C_L o C_H . Las moléculas de ácido nucleico que codifican V_L o V_H se conectan operativamente a continuación a una secuencia de ácido nucleico que codifica una C_L o C_H , respectivamente, de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto se puede lograr utilizando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H , como se describió anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 que originalmente era IgM se puede cambiar de clase a IgG. Además, el cambio de clase se

puede utilizar para convertir una subclase IgG en otra, p.ej., de IgG₁ a IgG₂. Una región constante de cadena ligera κ se puede reemplazar por una región constante de cadena ligera λ. Un método preferido para producir un anticuerpo de la invención con un isotipo de Ig deseado comprende las etapas de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica la

5 cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anti-PD -1 anticuerpo, obtener el dominio variable de la cadena pesada, ligar el dominio variable de la cadena pesada con la región constante de una cadena pesada del isotipo deseado, expresar la cadena ligera y la cadena pesada ligadas en una célula, y recoger el anticuerpo anti-PD-1 con el isotipo deseado.

10 El anticuerpo anti-PD-1 de la invención puede ser una IgG, una IgM, una IgE, una IgA o una IgD, pero típicamente es del isotipo IgG, p.ej., de la subclase de IgG IgG₁, IgG_{2a} o IgG_{2b}, IgG₃ o IgG₄. En una realización, el anticuerpo es una IgG₁. En otra realización, el anticuerpo es una IgG₄.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 puede comprender al menos una

15 mutación en la región Fc. Se conocen varias mutaciones de Fc diferentes, donde estas mutaciones proporcionan una alteración de la función efectora. Por ejemplo, en muchos casos será deseable reducir o eliminar la función efectora, p.ej., cuando no se desean interacciones ligando/receptor o en el caso de productos conjugados de anticuerpo-fármaco.

En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende al menos una mutación en la

20 región Fc que reduce la función efectora. Las posiciones de aminoácidos de la región Fc que puede ser ventajo mutar con el fin de reducir la función efectora incluyen una o más de las posiciones 228, 233, 234 y 235, donde las posiciones de aminoácidos se numeran de acuerdo con el esquema de numeración IMGT®.

En una realización, uno o ambos residuos de aminoácido en las posiciones 234 y 235

25 pueden estar mutados, por ejemplo de Leu a Ala (L234A L235A). Estas mutaciones reducen la función efectora de la región Fc de los anticuerpos IgG₁. Adicionalmente o alternativamente, el residuo de aminoácido en la posición 228 puede mutarse, p.ej., a Pro. En otra realización, el residuo de aminoácido en la posición 233 puede mutarse, p.ej., a Pro, el residuo de aminoácido en la posición 234 puede mutarse, p.ej., a Val, y/o el residuo de

30 aminoácido en la posición 235 puede mutarse, p.ej., a Ala. Las posiciones de los aminoácidos se numeran de acuerdo con el esquema de numeración IMGT®.

En otra realización, cuando el anticuerpo es de la subclase IgG₄, éste puede comprender la mutación S228P, es decir, tiene una prolina en la posición 228, donde la posición de aminoácidos se numera de acuerdo con el esquema de numeración IMGT®. Se sabe que esta mutación reduce el intercambio de brazos Fab no deseados.

5 En ciertas realizaciones, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención puede ser parte de una molécula de inmunoadherencia más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de tales moléculas de inmunoadherencia incluyen el uso de la región central de estreptavidina para formar una molécula de scFv tetramérica
10 (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas de scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.*, 31:1047-1058 (1994)). Otros ejemplos incluyen cuando una o más CDR de un anticuerpo se incorporan a una molécula, ya sea covalentemente o no covalentemente, para convertirla en
15 una inmunoadhesina que se une específicamente a un antígeno de interés. En tales realizaciones, las CDR se pueden incorporar como parte de una cadena polipeptídica más grande, se puede conectar covalentemente a otra cadena polipeptídica, o se puede incorporar no covalentemente.

 En otra realización, se puede preparar un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que
20 comprende la totalidad o una parte de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención conectado a otro polipéptido. En ciertas realizaciones, solo están conectados al polipéptido los dominios variables del anticuerpo anti-PD-1. En ciertas realizaciones, el V_H de un anticuerpo anti-PD-1 está conectado a un primer polipéptido, mientras que el V_L de un anticuerpo anti-PD-1 está conectado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de tal manera
25 que los dominios V_H y V_L puedan interactuar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno.

 En otra realización preferida, el dominio V_H está separado del dominio V_L por un conector de manera que los dominios V_H y V_L pueden interactuar unos con otros (p.ej., anticuerpos de cadena única). El anticuerpo V_H -conector- V_L se conecta después al
30 polipéptido de interés. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que se conectan entre sí dos (o más) anticuerpos de cadena única. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una única cadena polipeptídica, o si se quiere crear un

anticuerpo biespecífico.

Para crear un anticuerpo de cadena única (scFv), los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se conectan operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, p.ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4 -Ser)³, de manera que las
 5 secuencias de V_H y V_L se pueden expresar como una proteína de cadena sencilla contigua, con los dominios V_L y V_H unidos por el conector flexible. Véanse, p.ej., Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); y McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena sencilla puede ser monovalente, si solo se utiliza un único V_H y V_L; bivalente, si se utilizan dos V_H y V_L; o
 10 polivalente, si se utilizan más de dos V_H y V_L. Se pueden generar anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente a PD-1 humana y a otra molécula, por ejemplo.

En otras realizaciones, se pueden preparar otros anticuerpos modificados utilizando moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpo anti-PD-1. Por ejemplo, se pueden preparar "anticuerpos kappa" (Ill et al., *Protein Eng.* 10:949-57 (1997)), "minibodies" (Martin
 15 et al., *EMBO J.* 13:5303-9 (1994)), "fragmentos bivalentes (diabodies)" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)) utilizando técnicas de biología molecular convencionales siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

Un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno de la invención puede derivatizarse o unirse a otra molécula (p.ej., otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o porciones de los mismos se derivatizan de manera que la unión a PD-1 no se ve afectada adversamente por la derivatización o el marcaje. Por consiguiente, se pretende que los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención incluyan tanto las formas
 25 intactas como las modificadas de los anticuerpos anti-PD-1 humanos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede unir funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (p.ej., un anticuerpo biespecífico o un fragmento bivalente) , un agente de
 30 detección, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Se produce un tipo de anticuerpo derivatizado mediante entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, p.ej., para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un espaciador apropiado (p.ej., éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (p.ej., suberato de disuccinimidilo). Dichos conectores están disponibles, p.ej., de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Un anticuerpo anti-PD-1 también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, p.ej., para aumentar la semivida en el suero.

También se puede marcar un anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Según se utiliza en la presente memoria, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la incorporación de otra molécula al anticuerpo. En una realización, la marca es un marcador detectable, p.ej., la incorporación de un aminoácido radiomarcado o el anclaje a un polipéptido de radicales biotínico que pueden detectarse mediante avidina marcada (p.ej., estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o colorimétricos). En otra realización, la marca o el marcador pueden ser agentes terapéuticos, p.ej., un producto conjugado de fármaco o toxina. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas y se pueden utilizar. Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p.ej., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcas fluorescentes (p.ej., FITC, rodamina, fósforos basados en lantánidos), marcas enzimáticas (p.ej., peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p.ej., secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epitópicas), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como la toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y

puromicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunas realizaciones, las marcas están unidas por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

5 En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden estar presentes en una forma neutra (incluyendo formas zwitteriónicas) o como una especie cargada positiva o negativamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden complejarse con un contraión para formar una sal farmacéuticamente aceptable.

10 El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraiones, en donde los contraiones se obtienen de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Moléculas de unión biespecífica

15 En un aspecto adicional, la invención proporciona una molécula de unión biespecífica que tiene la especificidad de unión de un anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente memoria y la especificidad de unión de otro anticuerpo anti-PD-1 (p.ej., otro anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente memoria) o un anticuerpo que se dirige a una proteína diferente, tal como otra proteína inmunitaria de punto de control, un antígeno canceroso u otra molécula de superficie celular cuya actividad interviene en un estado de enfermedad tal como cáncer. Tales moléculas de unión biespecíficas son conocidas en la técnica, y ejemplos de diferentes tipos de moléculas de unión biespecíficas se proporcionan en otra
20 parte de la presente memoria.

Moléculas de ácidos nucleicos y vectores

La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico y secuencias que codifican anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de las mismas descritas en la presente memoria. En algunas realizaciones, diferentes moléculas de ácido nucleico
25 codifican las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo. En otras realizaciones, la misma molécula de ácido nucleico codifica las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo.

30 Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, debe entenderse que una referencia a un ácido

nucleico que tiene una secuencia concreta abarca su cadena complementaria, con su secuencia complementaria. El término "polinucleótido" como se ha mencionado en la presente memoria significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de hebra sencilla y doble.

La invención también proporciona secuencias de nucleótidos que son idénticas en al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% a una o más secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente memoria, por ejemplo, a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69-88. El término "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos se refiere a los residuos en dos secuencias que son las mismas cuando se alinean para una correspondencia máxima. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede estar en un tramo de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos, y preferiblemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Existen varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden utilizarse para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden comparar utilizando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas de Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, p.ej., los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre las secuencias problema y de búsqueda (véanse, p.ej., Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); y Pearson, *J. Mol. Biol.* 276: 71 - 84 (1998); incorporadas a la presente memoria como referencia). A menos que se especifique lo contrario, se utilizan los parámetros predeterminados para un programa o algoritmo concreto. Por ejemplo, se puede determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico utilizando FASTA con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o utilizando Gap con sus parámetros predeterminados proporcionados en GCG Versión 6.1, incorporados a la presente memoria como referencia.

En un aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 69-88.

5 En cualquiera de las realizaciones anteriores, se pueden aislar las moléculas de ácido nucleico.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector adecuado para expresar una de las cadenas de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria. El término "vector", según se utiliza en la presente memoria, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunas realizaciones, el vector es un plásmido, es decir, una
10 pieza circular de doble hebra de ADN en la que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales al genoma viral. En algunas realizaciones, los vectores son susceptibles de replicación autónoma en una célula anfitriona en la que se introducen (p.ej.,
15 vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). En otras realizaciones, los vectores (p.ej., vectores de mamíferos no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula anfitriona tras la introducción en la célula anfitriona, y de ese modo se replican junto con el genoma del anfitrión. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están conectados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente memoria "vectores de
20 expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

La invención proporciona vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención o una porción de unión a antígeno de la misma, la cadena ligera de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención o
25 una porción de unión a antígeno de la misma, o tanto las cadenas pesada como ligera de un anticuerpo anti-PD-1 de la invención o una porción de unión a antígeno de las mismas. La invención proporciona adicionalmente vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos y sondas de los mismos.

30 Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno de las mismas de la invención pueden aislarse de cualquier fuente que produzca dicho anticuerpo o porción. En diversas

realizaciones, las moléculas de ácido nucleico se aíslan de células B que expresan un anticuerpo anti-PD-1 aislado de un animal inmunizado con un antígeno PD-1 humana, o de una célula inmortalizada producida a partir de dicha célula B. Los métodos para aislar ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo son bien conocidos en la técnica. El ARNm se puede
5 aislar y utilizar para producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la clonación de ADNc de genes de anticuerpos. En ciertas realizaciones, se puede sintetizar en lugar de aislar una molécula de ácido nucleico de la invención.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_H de un anticuerpo anti-
10 PD-1 o porción de unión a antígeno de la invención unida en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena pesada de cualquier fuente. Del mismo modo, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio V_L de un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno de la invención unida en marco a una secuencia de nucleótidos que
15 codifica una región constante de cadena ligera de cualquier fuente.

En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de las cadenas pesada (V_H) y/o ligera (V_L) se pueden "convertir" en genes de anticuerpos completos. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H o V_L se convierten en genes de anticuerpos completos mediante la
20 inserción en un vector de expresión que ya codifican dominios constantes de cadena pesada (CH) o constantes de cadena ligera (CL), respectivamente, de manera que el segmento V_H está conectado operativamente al segmento o segmentos CH dentro del vector, y/o el segmento V_L está conectado operativamente al segmento CL dentro del vector. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios V_H y/o V_L se
25 convierten en genes de anticuerpos completos conectando, p.ej., ligando, una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio V_H y/o V_L a una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio CH y/o CL utilizando técnicas de biología molecular convencionales. Las moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y/o ligeras completas se pueden expresar a continuación a partir de una célula en la que se han introducido y aislar el
30 anticuerpo anti-PD-1.

Las moléculas de ácido nucleico pueden utilizarse para expresar de forma recombinante grandes cantidades de anticuerpos anti-PD-1. Las moléculas de ácido nucleico

también pueden utilizarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena sencilla, inmunoadhesinas, anticuerpos bivalentes, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe en la presente memoria.

En otra realización, una molécula de ácido nucleico de la invención se utiliza como
 5 sonda o cebador de PCR para una secuencia de anticuerpo específica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede utilizarse como una sonda en métodos de diagnóstico o como un cebador de PCR para amplificar regiones de ADN que podrían utilizarse, entre otros, para aislar moléculas adicionales de ácido nucleico que codifican dominios variables de anticuerpos anti-PD-1. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos.
 10 En algunas realizaciones, los oligonucleótidos provienen de dominios altamente variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de interés. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos codifican la totalidad o una parte de una o más de las CDR de los anticuerpos anti-PD-1 o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención como se describe en la presente memoria.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico y los vectores pueden utilizarse
 15 para producir anticuerpos anti-PD-1 mutados. Los anticuerpos pueden estar mutados en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, p.ej., para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, se puede realizar una mutación en una o más de las CDR para aumentar o disminuir la K_D del anticuerpo anti-PD-1, para aumentar o disminuir k_{off} , o
 20 para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. En otra realización, se realizan una o más mutaciones en un residuo de aminoácido que se sabe que se ha cambiado en comparación con la línea germinal en un anticuerpo monoclonal de la invención. Las mutaciones se pueden realizar en una CDR o región de marco de un dominio variable, o en una región constante. En una realización preferida, las mutaciones se realizan en un dominio
 25 variable. En algunas realizaciones, se realizan una o más mutaciones en un residuo de aminoácido que se sabe que se ha cambiado en comparación con la línea germinal en una CDR o región marco de un dominio variable de un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención.

En otra realización, la región o regiones marco se mutan de modo que la región o
 30 regiones marco resultantes tengan la secuencia de aminoácidos del gen correspondiente de la línea germinal. Se puede realizar una mutación en una región marco o región constante para aumentar la semivida del anticuerpo anti-PD-1. Véase, p.ej., la publicación PCT WO

00/09560. También se puede realizar una mutación en una región marco o región constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo y/o para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente a otra molécula. De acuerdo con la invención, un único anticuerpo puede tener mutaciones en una cualquiera o más de las CDR o regiones marco del dominio variable o en la región constante.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-PD-1 de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos se expresan insertando ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o completa, obtenidas como se describió anteriormente, en vectores de expresión tales que los genes se conectan operativamente a secuencias de control de la expresión necesarias tales como secuencias de control transcripcionales y traduccionales. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas tales como virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV y similares. La secuencia codificante del anticuerpo se puede ligar a un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y traducción dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y la traducción de la secuencia codificante del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se pueden elegir para que sean compatibles con la célula anfitriona de expresión utilizada. La secuencia codificante de la cadena ligera del anticuerpo y la secuencia codificante de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados, y se pueden conectar operativamente a la misma o a diferentes secuencias de control de la expresión (p.ej., promotores). En una realización, ambas secuencias codificantes se insertan en el mismo vector de expresión, y se pueden conectar operativamente a las mismas secuencias de control de expresión (p.ej., un promotor común), separar secuencias de control de expresión idénticas (p.ej., promotores) o a diferentes secuencias de control de la expresión (p.ej., promotores). Las secuencias codificantes de anticuerpos se pueden insertar en el vector de expresión por medio de métodos convencionales (p.ej., ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico del anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción).

Un vector conveniente es aquel que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados de manera que cualquier secuencia V_H o V_L pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se

describió anteriormente. Los genes que codifican HC y LC en dichos vectores pueden contener secuencias de intrones que darán como resultado aumentos de rendimientos globales de proteína de anticuerpo estabilizando el ARNm relacionado. Las secuencias intrónicas están flanqueadas por sitios donadores de empalme y aceptores de empalme, que

5 determinan dónde se producirá el empalme del ARN. La ubicación de las secuencias intrónicas puede ser en regiones variables o constantes de las cadenas de anticuerpos, o en ambas regiones variables y constantes cuando se utilizan intrones múltiples. La poliadenilación y la terminación de la transcripción se pueden producir en sitios cromosómicos nativos aguas abajo de las regiones codificantes. El vector de expresión

10 recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula anfitriona. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de manera que el péptido señal se une en marco al extremo amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulínica).

15 Además de los genes de la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula anfitriona. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula

20 anfitriona que se vaya a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células anfitrionas de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/potenciador de CMV), el Virus de Simio 40

25 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (p.ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), poliovirus y promotores de mamíferos fuertes tales como promotores nativos de inmunoglobulina y actina. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales, y las secuencias de los mismos, véanse, p.ej., las patentes de los Estados Unidos Núm. 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615. Los métodos para expresar

30 anticuerpos en plantas, que incluyen una descripción de promotores y vectores, así como la transformación de plantas, son conocidos en la técnica. Véase, p.ej., la Patente de Estados Unidos Núm. 6.517.529. Los métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, p.ej., células de levadura, también son bien conocidos en la técnica.

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células anfitrionas (p.ej., orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable
5 facilita la selección de células anfitrionas en las que se ha introducido el vector (véanse, p.ej., las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula anfitriona en la que se ha introducido el vector. Por ejemplo, los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de dihidrofolato
10 reductasa (DHFR) (para su uso en células anfitrionas dhfr⁻ con selección/amplificación con metotrexato), el gen neo (para selección con G418) y el gen de la glutamato sintetasa.

El término "secuencia de control de la expresión" según se utiliza en la presente memoria significa secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. Las
15 secuencias de control de la expresión incluyen secuencias de iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción apropiadas; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que mejoran la eficacia de traducción (es decir, la secuencia consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y
20 cuando se desee, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo anfitrión; en procariotas, tales secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, en general, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción.
25 Se pretende que el término "secuencias de control" incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión.

Células Anfitrionas y Métodos de Producción de Anticuerpos y Composiciones de anticuerpos

30

Un aspecto adicional de la invención se refiere a métodos para producir las composiciones anticuerpos y los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos

de la invención. Una realización de este aspecto de la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo como se define en la presente memoria, que comprende proporcionar una célula anfitriona recombinante capaz de expresar el anticuerpo, cultivar dicha célula anfitriona en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y aislar el anticuerpo resultante. Los anticuerpos producidos mediante tal expresión en tales células anfitrionas recombinantes se denominan en la presente memoria "anticuerpos recombinantes". La invención también proporciona células de la progenie de tales células anfitrionas, y anticuerpos producidos por las mismas.

El término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), según se utiliza en la presente memoria, significa una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La invención proporciona células anfitrionas que pueden comprender, p.ej., un vector de acuerdo con la invención descrito anteriormente. La invención también proporciona células anfitrionas que comprenden, p.ej., una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una porción de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo de la invención. Debe entenderse que "célula anfitriona recombinante" y "célula anfitriona" significan no solo la célula sujeto particular sino también la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones subsiguientes debido a mutaciones o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía se incluye dentro del alcance del término "célula anfitriona" según se utiliza en la presente memoria.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-PD-1 y vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar para la transfección de una célula anfitriona de mamífero, vegetal, bacteriana o de levadura adecuada. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula anfitriona. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de polinucleótidos en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir en células de mamífero mediante vectores virales. Los

métodos de transformación de células son bien conocidos en la técnica. Véanse, p.ej., las Patentes de los Estados Unidos 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. Los métodos de transformación de células vegetales son bien conocidos en la técnica, incluyendo, p.ej., transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los métodos de transformación de células bacterianas y de levadura también son bien conocidos en la técnica.

Las líneas celulares de mamíferos disponibles como anfitriones para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Colección (ATCC). Estas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células Freestyle 293 (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono africano verde (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p.ej., Hep G2), células A549 y varias otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que se pueden utilizar son líneas celulares de insectos, tales como las células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos son introducidos en células anfitrionas de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células anfitrionas durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se han cultivado las células anfitrionas. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales. Las células anfitrionas de vegetales incluyen, p.ej., *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células anfitrionas bacterianas incluyen *E. coli* y especies de *Streptomyces*. Las células anfitrionas de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Adicionalmente, la expresión de anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos a partir de líneas celulares de producción se puede mejorar utilizando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión génica de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para mejorar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se analiza en su totalidad o en parte en relación con las patentes EP 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferentes patrones de glicosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en la presente memoria, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria son parte de la presente invención, independientemente del estado de glicosilación de los anticuerpos, y más generalmente, independientemente de la presencia o ausencia de modificaciones postraduccionales.

Composiciones Farmacéuticas

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo (o como único ingrediente activo) un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo o composición de anticuerpo anti-PD-1 de la invención. La composición farmacéutica puede comprender cualquier composición de anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, las composiciones están destinadas a la mejora, prevención y/o tratamiento de un trastorno relacionado con PD-1 (p.ej., un trastorno caracterizado por la expresión en exceso o la hiperactividad de PD-1) y/o cáncer. En algunas realizaciones, las composiciones están destinadas a la activación del sistema inmunitario. En ciertas realizaciones, las composiciones están destinadas a la mejora, prevención y/o tratamiento del cáncer que se origina en tejidos tales como piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, el sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas.

Generalmente, los anticuerpos de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos son adecuados para administrarse como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, p.ej., como se describe a continuación.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenderán uno o más anticuerpos o porciones de unión anti-PD-1 de la invención, p.ej., uno o dos anticuerpos o porciones de unión anti-PD-1. En una realización, la composición comprende un único anticuerpo anti-PD-1 de la invención o porción de unión del mismo.

En otra realización, la composición farmacéutica puede comprender al menos un anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo, p.ej., un anticuerpo o porción anti-PD-1 y uno o más anticuerpos adicionales que se dirigen a uno o receptores de

superficie celular más relevantes, p.ej., uno o más receptores relevantes para el cáncer.

El término "excipiente" se utiliza en la presente memoria para describir cualquier ingrediente distinto del compuesto o los compuestos de la invención. La elección del excipiente o los excipientes dependerá en gran medida de factores tales como el modo concreto de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y la estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación. Según se utiliza en la presente memoria, "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, p.ej., azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades mínimas de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o eficacia del anticuerpo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y los métodos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Tales composiciones y métodos para su preparación se pueden encontrar, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición (Mack Publishing Company, 1995). Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones GMP (buenas prácticas de fabricación).

Una composición farmacéutica de la invención se puede preparar, envasar o comercializar a granel, como una única dosis unitaria, o como una pluralidad de dosis unitarias únicas. Según se utiliza en la presente memoria, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, p.ej., la mitad o una tercera parte de dicha dosificación.

Cualquier método para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos aceptados en la técnica puede emplearse adecuadamente para los anticuerpos y porciones de unión a

antígeno de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención son típicamente adecuadas para administración parenteral. Según se utiliza en la presente memoria, la "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración
5 caracterizada por ruptura física de un tejido de un sujeto y administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido, lo que generalmente da como resultado la administración directa al torrente sanguíneo, al músculo o a un órgano interno. La administración parenteral incluye así, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, mediante la aplicación de
10 la composición a través de una incisión quirúrgica, mediante la aplicación de la composición a través de una herida no quirúrgica que penetra en el tejido, y similares. En particular, se contempla la administración parenteral que incluye, pero no se limita a, inyección o infusiones subcutáneas, intraperitoneales, intramusculares, intraesternales, intravenosas, intraarteriales, intratecales, intraventriculares, intrauretrales, intracraneales e intrasinoviales; y
15 técnicas de infusión de diálisis renal. También se contempla la perfusión regional. Las realizaciones preferidas incluyen las rutas intravenosa y subcutánea.

Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral comprenden típicamente el ingrediente activo combinado con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Dichas
20 formulaciones se pueden preparar, envasar o comercializar en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o comercializar en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en recipientes multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones,
25 emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y similares. Tales formulaciones pueden comprender adicionalmente uno o más ingredientes adicionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes de suspensión, estabilizantes o dispersantes. En una realización de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir, polvo o gránulos) para la reconstitución con un vehículo adecuado (p.ej.,
30 agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponadores

(preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para utilizar junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril libre de pirógenos. Las formas de administración parenteral ilustrativas incluyen soluciones o suspensiones en soluciones
5 acuosas estériles, por ejemplo, soluciones acuosas de propilenglicol o dextrosa. Dichas formas de dosificación se pueden tamponar adecuadamente, si se desea. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, o en una preparación liposómica. Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para que sean de
10 liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Por ejemplo, en un aspecto, las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el anticuerpo anti-PD-1 o la porción de unión a antígeno del mismo o la composición de anticuerpo anti-PD-1 en la cantidad requerida en un disolvente apropiado
15 con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos
20 preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo. La fluidez apropiada de una solución puede mantenerse, p.ej., mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el
25 uso de tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina, y/o mediante el uso de recubrimientos de liberación modificada (p.ej. recubrimientos de liberación lenta).

Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o
30 mediante inhalación, típicamente en forma de un polvo seco (solo, como una mezcla, o como una partícula de componentes mixtos, por ejemplo, mezclado con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado) desde un inhalador de polvo seco, como un aerosol

desde un recipiente, bomba, pulverizador, atomizador presurizados (preferiblemente un atomizador que usa electrohidrodinámica para producir una neblina fina) o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado, o como gotas nasales.

5 El recipiente, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador presurizados generalmente contienen una solución o suspensión de un anticuerpo de la invención que comprende, p.ej., un agente adecuado para dispersar, solubilizar o prolongar la liberación del agente activo, uno o varios propelentes como disolvente.

10 Antes del uso en una formulación de polvo seco o suspensión, el producto farmacéutico generalmente se microniza a un tamaño adecuado para la administración mediante inhalación (típicamente menos de 5 micrómetros). Esto se puede lograr mediante cualquier método de trituración apropiado, tal como molienda por chorro en espiral, molienda por chorro de lecho fluido, procesamiento de fluido supercrítico para formar nanopartículas, homogeneización a alta presión o secado por pulverización.

15 Las cápsulas, ampollas y cartuchos para utilizar en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base en polvo adecuada y un modificador del rendimiento.

20 Una formulación en solución adecuada para uso en un atomizador que utiliza electrohidrodinámica para producir una neblina fina puede contener una dosis adecuada del anticuerpo de la invención por accionamiento y el volumen de accionamiento puede variar, p.ej., de 1 μ l a 100 μ l.

Se pueden añadir aromas adecuados, tales como mentol y levomentol, o edulcorantes, tales como sacarina o sacarina sódica, a aquellas formulaciones de la invención destinadas a administración inhalada/intranasal.

25 Las formulaciones para administración inhalada/intranasal se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

30 En el caso de inhaladores de polvo seco y aerosoles, la unidad de dosificación se determina por medio de una válvula que suministra una cantidad medida. Las unidades de acuerdo con la invención están dispuestas típicamente para administrar una dosis medida o "inhalación" de un anticuerpo de la invención. La dosis diaria global típicamente se

administrará en una sola dosis o, más habitualmente, como dosis divididas a lo largo del día.

Los anticuerpos y porciones de anticuerpos de la invención también pueden formularse para una administración por vía oral. La administración oral puede implicar la deglución, de modo que el compuesto ingrese al tracto gastrointestinal y/o administración bucal, lingual o sublingual por medio de la cual el compuesto ingresa a la corriente sanguínea directamente desde la boca.

Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen sistemas sólidos, semisólidos y líquidos tales como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen productos multi- o nanoparticulados, líquidos o polvos; pastillas (incluidas las rellenas de líquido); chicles; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; aerosoles; y parches bucales/mucoadhesivos.

Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Dichas formulaciones pueden emplearse como cargas en cápsulas blandas o duras (elaboradas, por ejemplo de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa) y típicamente comprenden un vehículo, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también se pueden preparar mediante la reconstitución de un sólido, por ejemplo, a partir de una bolsita.

Usos terapéuticos de anticuerpos y composiciones de la invención

En un aspecto, los anticuerpos anti-PD-1 y sus porciones de unión a antígeno, las composiciones anti-PD-1 y las moléculas de unión biespecíficas de la invención se utilizan para potenciar o activar el sistema inmunitario en un ser humano que lo necesite. En algunas realizaciones, el paciente tiene una afección caracterizada por expresión en exceso o hiperactividad de PD-1. En algunas realizaciones, el paciente está inmunosuprimido. En ciertas realizaciones, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo, composición o composición farmacéutica de molécula de unión biespecífica es para su uso en el tratamiento del cáncer, p.ej., cánceres que se originan en tejidos tales como piel, pulmón, intestino, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, vejiga, mama, estómago, útero y páncreas, y cánceres u otras afecciones que dependen de la actividad de PD-1 o en las que el paciente expresa o expresa en exceso PD-L1, PD-L2 o ambos. Los cánceres tratados por los anticuerpos anti-PD-1, sus porciones de

unión a antígeno, las composiciones de anticuerpo anti-PD-1, y/o las moléculas de unión
 biespecíficas de la invención pueden incluir, por ejemplo, melanoma (tal como melanoma
 avanzado o no resecable o melanoma metastásico), cáncer de pulmón de células no
 pequeñas, cáncer de vejiga, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de
 5 ovario, cáncer colorrectal, linfoma de Hodgkin y carcinoma de células renales (RCC).

En algunas realizaciones, los cánceres tratados mediante los anticuerpos anti-PD-1,
 porciones de unión a antígeno, composiciones anti-PD-1 y/o moléculas de unión
 biespecíficas de la invención pueden incluir, por ejemplo, melanoma (p.ej. melanoma
 avanzado o metastásico), cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células
 10 escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células renales, linfoma de Hodgkin, linfoma no
 Hodgkin, glioblastoma, glioma, cáncer de pulmón de células escamosas, cáncer de pulmón
 de células pequeñas, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario
 superior, cáncer de esófago, cáncer de la unión gastroesofágica, cáncer gástrico, cáncer de
 hígado, cáncer de colon, carcinoma colorrectal, mieloma múltiple, sarcomas, leucemia
 15 mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, síndrome mielodisplásico, cáncer nasofaríngeo,
 leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, linfoma linfocítico pequeño, cáncer
 de ovario, cáncer gastrointestinal, cáncer peritoneal primario, cáncer de trompas de Falopio,
 cáncer urotelial, leucemia/linfoma de células T asociado a HTLV, cáncer de próstata, cáncer
 genitourinario, meningioma, cáncer de la corteza suprarrenal, gliosarcoma, fibrosarcoma,
 20 cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de endometrio, cáncer de
 células basales de la piel, cáncer del apéndice, cáncer del tracto biliar, cáncer de la glándula
 salival, cáncer avanzado de células de Merkel, linfoma difuso de células B grandes, linfoma
 folicular, mesotelioma y tumores sólidos.

"Tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o anular un
 25 trastorno biológico y/o al menos uno de sus síntomas concomitantes. Según se utiliza en la
 presente memoria, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la
 gravedad y/o la frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o
 afección. Además, las referencias en la presente memoria a "tratamiento" incluyen
 referencias a tratamientos curativos, paliativos y profilácticos.

30 "Cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de agente terapéutico que
 se administra que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas del trastorno que se
 está tratando. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico anticanceroso

puede dar como resultado una reducción del tumor, una mayor supervivencia, la eliminación de células cancerosas, la disminución de la progresión de la enfermedad, la reversión de metástasis u otros parámetros clínicos deseados por los profesionales de la salud.

5 Las composiciones de anticuerpos o anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden administrar solas o combinadas con uno o más de otros fármacos o anticuerpos (o como cualquier combinación de los mismos). Las composiciones farmacéuticas, métodos y usos de la invención también abarcan por tanto realizaciones de combinaciones (administración conjunta) con otros agentes activos, como se detalla a continuación.

10 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que los términos "administración conjunta", "administrado conjuntamente" y "combinado con", que se refieren a las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención con uno o más agentes terapéuticos diferentes, significa que, y se refieran e incluyan lo siguiente:

15 - administración simultánea de dicha combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales componentes se formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,

20 - administración sustancialmente simultánea de tal combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales componentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que son tomadas prácticamente al mismo tiempo por dicho paciente, tras lo cual dichos componentes se liberan
25 sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,

- administración secuencial de tal combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando tales componentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que son tomados en tiempos
30 consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, después de lo cual dichos componentes se liberan en tiempos

sustancialmente diferentes en dicho paciente; y

- administración secuencial de tal combinación de composición de anticuerpo/anticuerpo/porción de unión a antígeno de la invención y agente o agentes terapéuticos a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se
5 formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes de una forma controlada, después de lo cual se liberan de manera simultánea, consecutiva y/o superpuesta en el mismo y/o diferentes momentos a dicho paciente,

donde cada parte puede ser administrada por la misma ruta o por una diferente.

Las composiciones de anticuerpo y anticuerpos y sus porciones de unión a antígeno
10 de la invención se pueden administrar sin tratamientos terapéuticos adicionales, es decir, como una terapia independiente. Alternativamente, el tratamiento con las composiciones de anticuerpo y anticuerpos y sus porciones de unión a antígeno de la invención puede incluir al menos un tratamiento terapéutico adicional (terapia combinada). En algunas realizaciones, la composición de anticuerpo o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se pueden
15 administrar o formular conjuntamente con otra medicación/fármaco para el tratamiento del cáncer. El tratamiento terapéutico adicional puede comprender, p.ej., un agente quimioterapéutico, antineoplásico o antiangiogénico, un anticuerpo anticanceroso diferente y/o radioterapia.

Mediante la combinación de las composiciones de anticuerpo, anticuerpos o
20 porciones de unión a antígeno de la invención con agentes que se sabe que inducen la diferenciación terminal de células cancerosas, el efecto puede mejorarse adicionalmente. Tales compuestos pueden, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en ácido retinoico, ácidos trans-retinoicos, ácidos cis-retinoicos, fenilbutirato, factor de crecimiento nervioso, dimetilsulfóxido, forma activa de vitamina D3, receptor gamma activado por el
25 proliferador de peroxisomas, 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol, hexameten-bis-acetamida, factor de crecimiento transformante-beta, ácido butírico, AMP cíclico y vesnarinona. En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en ácido retinoico, fenilbutirato, ácido todo-trans-retinoico y forma activa de vitamina D.

Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpo anti-PD-
30 1 o anticuerpo anti-PD-1 o porción de unión a antígeno del mismo de la invención y al menos otro agente (p.ej., un agente quimioterapéutico, antineoplásico o antiangiogénico) se puede

utilizar como un tratamiento combinado para la administración simultánea, separada o sucesiva en la terapia contra el cáncer. El otro agente puede ser cualquier agente adecuado para el tratamiento del cáncer concreto en cuestión, por ejemplo, un agente seleccionado del grupo que consiste en agentes alquilantes, por ejemplo, derivados de platino tales como

5 cisplatino, carboplatino y/u oxaliplatino; alcaloides de plantas, por ejemplo, paclitaxel, docetaxel y/o irinotecán; antibióticos antitumorales, por ejemplo, doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, epirubicina, idarrubicina mitoxantrona, dactinomicina, bleomicina, actinomicina, luteomicina y/o mitomicina; inhibidores de topoisomerasa tales como topotecán; y/o antimetabolitos, por ejemplo, fluorouracilo y/u otras fluoropirimidinas.

10 Un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo o composición de anticuerpo anti-PD-1 de la invención también se pueden utilizar combinados con otras terapias contra el cáncer tales como vacunas, citoquinas, inhibidores de enzimas y terapias con células T. En el caso de una vacuna, ésta puede ser, p.ej., una vacuna de proteína, péptido o ADN que contiene uno o más antígenos que son relevantes para el cáncer que se

15 está tratando, o una vacuna que comprende células dendríticas junto con un antígeno. Las citoquinas adecuadas incluyen, por ejemplo, IL-2, IFN-gamma y GM-CSF. Un ejemplo de un tipo de inhibidor de enzima que tiene actividad anticancerosa es un inhibidor de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), por ejemplo 1-metil-D-triptófano (1-D-MT). La terapia con células T adoptiva se refiere a diversas técnicas de inmunoterapia que implican la expansión o

20 modificación genética de las células T de los propios pacientes para reconocer y atacar sus tumores.

También se contempla que un anticuerpo anti-PD-1 o una porción de unión a antígeno del mismo o una composición de anticuerpo anti-PD-1 de la invención se pueden utilizar en tratamiento coadyuvante en relación con inhibidores de tirosina quinasa. Estos son

25 moléculas sintéticas, principalmente derivadas de quinazolina, de bajo peso molecular que interactúan con el dominio de receptores de tirosina quinasa intracelular e inhiben la fosforilación del receptor inducida por ligando al competir por el sitio de unión de Mg-ATP intracelular.

En algunas realizaciones, la composición de anticuerpo o anticuerpo o porción de

30 unión a antígeno del mismo se pueden utilizar combinados con otro medicamento/fármaco que media la activación del sistema inmunitario, que incluye, pero no se limita a, un agente que media la expresión o actividad de A2AR, BLTA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28,

CD40, CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (p.ej., CEACAM-1 y/o CEACAM-5), GAL9, GITR, HVEM, ICOS, IDO, KIR, LAIR1, LAG-3, OX40, TIGIT, TIM-3, TGFR-beta, VISTA y/o 2B4. En ciertas realizaciones, el agente es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una de las moléculas anteriores. En ciertas realizaciones, la composición de anticuerpo o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención se pueden administrar combinados con un inhibidor de CTLA-4 (p.ej., un anticuerpo anti-CTLA-4 tal como tremelimumab o ipilimumab). En una realización, la composición de anticuerpo o anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de la invención se pueden administrar combinados con ipilimumab.

En ciertos aspectos, los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de la invención se pueden administrar combinados con otro inhibidor de la ruta de PD-1, que puede dirigirse a PD-1 o a uno o más de sus ligandos. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen otros anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-PD-L2. En algunas realizaciones, una composición de anticuerpo, anticuerpo y/o porción de unión a antígeno de la invención se pueden administrar combinados con pembrolizumab y/o nivolumab.

Se entiende que las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención se pueden utilizar en un método de tratamiento como se describe en la presente memoria, pueden utilizarse en un tratamiento como se describe en la presente memoria, y/o pueden ser para su uso en la fabricación de un medicamento para un tratamiento como se describe en la presente memoria.

Dosis y Ruta de Administración

Las composiciones de anticuerpos de la invención se administrarán en una cantidad eficaz para el tratamiento de la afección en cuestión, es decir, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios para lograr un resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar de acuerdo con factores tales como la afección concreta que se vaya a tratar, la edad, el sexo y el peso del paciente, y si los anticuerpos se administran como un tratamiento independiente o combinados con uno o más tratamientos contra el cáncer adicionales.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse

proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en formas de dosificación unitarias por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria, según se utiliza en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes/sujetos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Los requisitos para las formas de dosificación unitaria de la invención están dictados generalmente por, y son directamente dependientes de, (a) las características únicas del agente quimioterapéutico concreto o el efecto profiláctico que se deba lograr, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Por lo tanto, el experto en la técnica apreciaría, en base a la descripción proporcionada en la presente memoria, que la dosis y el régimen de dosificación se ajustan de acuerdo con métodos bien conocidos en las técnicas terapéuticas. Es decir, la dosis máxima tolerable se puede establecer fácilmente, y también se puede determinar la cantidad eficaz que proporciona un beneficio terapéutico detectable para un paciente, al igual que los requisitos temporales para administrar cada agente para proporcionar un beneficio terapéutico detectable para el paciente. Por consiguiente, aunque en la presente memoria se ilustran ciertas dosis y regímenes de administración, estos ejemplos de ninguna manera limitan la dosis y el régimen de administración que se pueden proporcionar a un paciente en la práctica de la presente invención.

Debe observarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se vaya a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y los intervalos de dosificación establecidos en la presente memoria descriptiva son solo ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición incorporada. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de esta invención puede basarse en una variedad de factores, que incluyen el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, el estado médico del paciente, la gravedad de la afección, la vía de

administración, y el anticuerpo concreto empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero puede determinarse de forma rutinaria utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, las dosis pueden ajustarse en función de los parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o valores de laboratorio. Por tanto, la presente invención abarca el aumento o
5 disminución progresivos de las dosis intrapaciente según determine el experto en la técnica. La determinación de las dosificaciones y regímenes apropiados es bien conocida en la técnica relevante y se entendería que está abarcada por el experto en la técnica una vez que se proporcionan las enseñanzas divulgadas en la presente memoria.

10 Se contempla que una dosis adecuada de una composición de anticuerpo de la invención estará en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,5 a 50 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 20 mg/kg. La composición de anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, a una dosificación de al menos 0,25 mg/kg, por ejemplo, al menos 0,5 mg/kg, tal como al menos 1 mg/kg, p.ej., al menos 1, 5 mg/kg, tal como al menos
15 2 mg/kg, p.ej., al menos 3 mg/kg, tal como al menos 4 mg/kg, p.ej., al menos 5 mg/kg; y, p.ej., hasta 50 mg/kg como máximo, tal como hasta 30 mg/kg como máximo, p.ej., hasta 20 mg/kg como máximo, tal como hasta 15 mg/kg como máximo. La administración normalmente se repetirá a intervalos adecuados, por ejemplo, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas, y durante
20 el tiempo que el médico responsable considere apropiado, que puede aumentar o disminuir opcionalmente la dosificación cuando sea necesario.

Se puede medir una cantidad eficaz para la terapia tumoral por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas en un paciente, y preferiblemente para invertir la progresión de la enfermedad, p.ej., reduciendo el tamaño del
25 tumor. La capacidad de un anticuerpo o la composición de la invención para inhibir el cáncer se puede evaluar mediante análisis in vitro, p.ej., como se describe en los ejemplos, así como en modelos animales adecuados que son predictivos de la eficacia en tumores humanos. Se seleccionarán regímenes de dosificación adecuados para proporcionar una respuesta terapéutica óptima en cada situación concreta, por ejemplo, administrados como
30 un solo bolo o como una infusión continua, y con el posible ajuste de la dosificación según lo indicado por las exigencias de cada caso.

Los anticuerpos de la presente invención también son útiles en procesos de diagnóstico (p.ej., in vitro, ex vivo). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden utilizar para detectar y/o medir el nivel de PD-1 en una muestra de un paciente (p.ej., una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal tal como un exudado inflamatorio, sangre, suero, fluido intestinal, saliva u orina). Los métodos de detección y medición adecuados incluyen métodos inmunológicos tales como citometría de flujo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos de quimioluminiscencia, radioinmunoensayo e inmunohistología. La invención abarca adicionalmente kits (p.ej., kits de diagnóstico) que comprenden los anticuerpos descritos en la presente memoria.

A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrá los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. Los métodos y materiales ilustrativos se describen a continuación, aunque también se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones,.

Generalmente, la nomenclatura utilizada en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química orgánica sintética, química medicinal y farmacéutica, y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria.

Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. A lo largo de esta memoria descriptiva y realizaciones, se entenderá que las palabras "tiene" y "comprende" o variaciones tales como "tiene", "que tiene", "comprende" o "que comprende" implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros establecidos pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en su totalidad. Aunque se citan varios documentos en la presente memoria, estas citas no constituye una admisión de que ninguno de estos

documentos forma parte del conocimiento general común de la técnica.

Para que la presente invención pueda entenderse mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

5

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Clonación de anticuerpos anti-PD-1 a partir de células B de pollo

La clonación de genes de anticuerpos derivados de pollo a partir de células B secretoras de anticuerpos (ASC) se realizó por medio de la tecnología de descubrimiento de anticuerpos Symplex™. Brevemente, se aislaron ASC de órganos linfoides de pollos que se
 10 habían inmunizado con antígeno PD-1, como antígeno proteico soluble y/o en su forma nativa unida a membrana celular presentada en células eucariotas. La tinción de las ASC con anticuerpos marcados con fluorescencia permitió la discriminación de las ASC de otras células (p.ej., células T, células B no sometidas a tratamiento previo, monocitos, etc.) antes de la clasificación en los recipientes de PCR. La clasificación individual de ASC se realizó
 15 mediante citometría de flujo. Posteriormente, se llevó a cabo el procedimiento Symplex™ para generar productos de PCR que contenían pares V_H y V_L para cada célula B ordenados como se describe más adelante.

La conexión de secuencias codificantes de V_H y V_L se realizó en las ASC clasificadas, facilitando el emparejamiento cognado de las secuencias. El proceso utilizó un procedimiento
 20 de PCR de dos etapas basado en RT-PCR de solapamiento-extensión múltiplex de dos etapas seguido de PCR anidada. El principio para el enlace de secuencias de V_H y V_L cognadas utilizando la tecnología Symplex™ se describe en detalle en los documentos WO 2005/042774; WO 2008/104184; WO 2010/022738, y Meijer et al., *J Mol Biol* 358(3):764-72 (2006). Brevemente, los fragmentos V_H y V_L cognados amplificados se unen mediante PCR
 25 solapamiento-extensión en una etapa denominada de PCR anidada. En el procedimiento posterior, los productos de PCR se agrupan antes de la clonación en un vector plasmídico. Esto se hace de tal manera que los fragmentos de ADN clonados que codifican los dominios variables del anticuerpo de pollo puedan expresarse como un anticuerpo quimérico completo a partir de una única construcción de expresión de plásmido en células de mamífero
 30 transfectadas. Consecuentemente, es posible escrutar los sobrenadantes celulares para determinar los anticuerpos quiméricos que muestran unión específica al antígeno PD-1.

Materiales y métodos

La tecnología Symplex™ como se describe en las publicaciones mencionadas anteriormente se modificó para amplificar V_L y V_H de células B de pollo clasificadas. La clonación de una construcción de expresión funcional se realizó en dos etapas, tal como se describe a continuación.

Etapa 1. Los productos de PCR amplificados que contienen los fragmentos V_H y V_L emparejados se amplificaron en una reacción de PCR anidada. Esto permitió la adición de sitios de reconocimiento de enzimas de restricción flanqueantes para Apal y AvrII en cada extremo. Dado que las secuencias de V_H y V_L cognadas fueron emparejadas en un único producto de PCR de cada ASC clasificada, la clonación de los productos de PCR se realizó después de agrupar todos los fragmentos de PCR. El plásmido pML392 se construyó para recibir los productos de PCR Symplex™ por digestión de los sitios de restricción correspondientes Apal y AvrII. La ligación resultante de productos de PCR agrupados y pML392 se muestra en la Figura 1. Aquí la inserción del producto de PCR colocó las secuencias de V_H y V_L frente a CH1-CH2-CH3 humanas y regiones de ADNc constante lambda, respectivamente, de modo que se obtuvieron los marcos de lectura de cadena pesada y ligera completas.

Etapa 2. En las construcciones iniciales, los dos marcos de lectura que codifican las secuencias de cadena pesada y ligera se colocaron cabeza a cabeza y separados por una secuencia de ADN que contenía sitios de reconocimiento de enzimas de restricción para AscI y NheI. Mediante la inserción de un fragmento de ADN del promotor de CMV doble digerido con AscI/NheI correspondiente que incluía las UTR 5' y péptidos señal entre los dos extremos 5' de los genes de cadena pesada y ligera, se obtuvo una construcción de expresión completa como se representa en la Figura 2.

25 Ejemplo 2: Clonación de análogos de anticuerpos de referencia anti-PD-1

Este ejemplo explica brevemente cómo se generaron los análogos de referencia de los anticuerpos anti-PD-1 nivolumab y pembrolizumab.

Las secuencias de aminoácidos que codifican los dominios de cadena pesada y ligera variables de los análogos de anticuerpos de nivolumab y pembrolizumab se obtuvieron de la sitio web de IMGT® imgt.org/mAb-DB/; véase la Tabla 3 a continuación. Las secuencias de proteína se tradujeron de forma inversa a secuencias de ADN con uso de

codones humanos. Las secuencias de ADN correspondientes se sintetizaron a continuación y se clonaron en vectores de expresión que contienen dominios constantes de cadena pesada o de cadena ligera kappa de IgG₄ humana, dando como resultado la expresión de anticuerpos completos. Para evitar el intercambio de brazo Fab, el residuo de serina en la posición 228 se sustituyó por prolina (Angal et al., *Mol. Immunol.*, 30:105-108 (1993)). Las células CHO se transfectaron con los plásmidos de expresión correspondientes utilizando un sistema de expresión de proteínas convencional. Los sobrenadantes de anticuerpo correspondientes se purificaron utilizando cromatografía en columna de purificación de proteína A convencional.

Tabla 3 Análogos de anticuerpos sintetizados genéticamente

Anticuerpo	Código	Formato de anticuerpo	Página web de Referencia
Pembrolizumab/ KEYTRUDA®	MK-3475	IgG ₄ recombinante, S228P	imgt.org/mAb- DB/mAbcard?AbId=472
Nivolumab/ OPDIVO®	BMS-936558, MDX- 1106, ONO-4538	IgG ₄ recombinante, S228P	imgt.org/mAb- DB/mAbcard?AbId=424

Ejemplo 3: Escrutinio de repertorios de anticuerpos para su unión a PD-1 expresada en la superficie celular

Los anticuerpos clonados del repertorio anti-PD-1 se transfectaron individualmente y se expresaron en células HEK293 utilizando el Reactivo de transfección 293fectin™ (Invitrogen, Núm. Cat. 12347-019) en formato de 384 pocillos, y se recogieron los sobrenadantes que contenían anticuerpos el día 6 después de la transfección.

Para el escrutinio de anticuerpos basado en células, las células CHO-S se transfectaron en formato de 384 pocillos para expresar PD-1 humana completa utilizando el reactivo Freestyle™ MAX (Invitrogen, Núm. Cat. 16447-100), y las células no transfectadas se utilizaron como control negativo. Para permitir una configuración de escrutinio multiplexado, las células no transfectadas se marcaron utilizando CFSE y se mezclaron con

células transfectadas con PD-1 no marcadas a una razón de 1 a 1, y una densidad de 1E6 célula por ml, cada una. En placas de 384 pocillos, se mezclaron 40 µl de esta mezcla celular con 10 µl del sobrenadante que contenía anticuerpo, y el anticuerpo unido a la célula se reveló mediante la adición de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana (H+L) AF647 (Molecular Probes, Núm. Cat. A21445) en una configuración sin lavado. Las muestras se adquirieron utilizando citometría de flujo de alto rendimiento (iQue® Screener, Intellicyt) y los datos se analizaron utilizando soporte lógico ForeCyt® trazando CFSE frente a la unión de IgG humana (AF647). Los éxitos primarios específicos de PD-1 se identificaron como clones de anticuerpos que se unen solo a células transfectadas con PD-1 humana (negativo para CFSE), pero no a células control (positivo para CFSE), y se recogieron números de placa y las coordenadas de placa para la selección de los éxitos y posterior análisis de la secuencia.

Las Figuras 3A-3C muestran gráficos de puntos de citometría de flujo representativos para (A) un clon de anticuerpo que se une específicamente a células transfectadas con PD-1 humana, (B) un clon que no se une específicamente a células CHO-S, y (C) un clon que no se une a ninguna de las poblaciones celulares utilizadas en el escrutinio.

Ejemplo 4: Humanización de anticuerpos anti-PD-1

La humanización de las regiones marco de los anticuerpos anti-PD-1 de pollo se realizó con el fin de producir moléculas de anticuerpo que tienen inmunogenicidad mínima cuando se administran a seres humanos, a la vez que retienen sustancialmente la especificidad y afinidad de los anticuerpos parentales de pollo.

Materiales y métodos

La humanización de los anticuerpos derivados de pollo se realizó utilizando el enfoque de "injerto de CDR", un método originalmente descrito por Jones et al., *Nature* **321**:522-525 (1986). En primer lugar, se utilizó la herramienta BLAST con los dominios pesado variable (V_H) y ligero variable (V_L) de los anticuerpos frente a bases de datos de IgG humanas con el fin de encontrar genes de la línea germinal humana más cercana. Esto identificó los genes humanos IGHV3-23*01 (M99660) e IGLV3-19*01 (X56178) como los más cercanos a los genes V_H y V_L del pollo, respectivamente. Del mismo modo, las secuencias de aminoácidos humanos seleccionados para humanización de la región del gen J se obtuvieron a partir de IGHJ1*01 (J00256) y IGLJ6*01 (M18338) para V_H y V_L,

respectivamente. Además, los genes de V_H y V_L del anticuerpo se alinearon frente a los genes de la línea germinal de inmunoglobulina de pollo para identificar mutaciones somáticas en las regiones marco que pueden jugar un papel en la función y/o estructura de los anticuerpos. Dichos residuos pueden incluirse en los genes del anticuerpo humanizado
 5 finales como los denominados residuos de "retromutación". Finalmente, se considera que algunas posiciones de aminoácidos, los denominados "residuos de Vernier" (Foote y Winter, *J Mol Biol.* **224(2)**:487-99 (1992)), que se sabe que juegan un papel importante en la estructura, estabilidad y función de los anticuerpos, generan variantes de anticuerpos humanizados alternativos que incluyen residuos humanos o de pollo de las líneas germinales
 10 correspondientes.

Las secuencias de CDR de la presente memoria se determinaron de acuerdo con las definiciones de IMGT® para CDR1 y CDR2. Para CDR3 de la cadena pesada y ligera, las definiciones en la presente memoria incluyen un residuo adicional de aminoácidos aguas arriba de IMGT-CDR3 (Cys) y un residuo de aminoácido adicional aguas abajo (Trp para
 15 CDR3 de V_H , Phe para CDR3 de V_L).

El ensamblaje de la CDR de pollo y de las regiones marco humanas se realizó mediante PCR de extensión del solapamiento. Los productos de PCR de V_H and V_L humanizados resultantes se clonaron en vectores de expresión (plásmidos) que albergan regiones constantes de cadena pesada y ligera humana. Para aumentar la escisión correcta
 20 del péptido señal aguas arriba de la cadena lambda, el segundo aminoácido (Ser) del gen lambda IGLV3.19 se reemplazó por otro aminoácido (Tyr) que está presente en otras líneas germinales humanas, por ejemplo IGLV3.25. La secuencia de la cadena pesada contiene las dos mutaciones "LALA" (L234A L235A) conocidas por reducir la función efectora de la región Fc de los anticuerpos IgG1 (Armour et al., *Eur J Immunol.* **29(8)**:2613-24 (1999); y Armour et al., *Mol Immunol.* **40(9)**:585-93 (2003)). El vector de expresión también contenía las
 25 secuencias reguladoras necesarias, permitiendo la expresión simultánea de cadenas ligeras y pesadas que se ensamblan para proporcionar anticuerpos completos después de la transfección de células de mamífero.

Resultados

30 Las secuencias de anticuerpos humanizados finales se muestran a continuación en la Tabla 4, y las secuencias de CDR se muestran por separado en las secuencias de la Tabla 5. Las secuencias CDR se definen en las Tablas de acuerdo con el esquema de numeración

IMGT®.

Tabla 4 Secuencias V_H y V_L de anticuerpos anti-PD-1 humanizados*

Anticuerpo humanizado	Secuencia de aminoácidos de V _H	Secuencia de aminoácidos de V _L
[12819.15384]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS <u>GFTFTRYD</u> MVWVRQAPGKGLE WVAG <u>IGDSNKM</u> TRYAPAVKGRAT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYY <u>CAKGSCIACWDEAGRIDA</u> WG QGTLTVTVSS (SEQ ID NO: 2)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>G</u> <u>SYDGSSY</u> YGWYQQKPGQAPVTVIY <u>NN</u> <u>NN</u> RPSDIPDRFSGSSSGNTASLTITG AQAED EADYY <u>CGSYDRPETNSDYVGM</u> <u>FG</u> SGTKVTVL (SEQ ID NO: 3)
[12748.15381]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FTFSDY</u> AMNWVRQAPGKGLEWVA <u>GIGNDGSYT</u> NYGAAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CASDI</u> <u>RSRND</u> <u>CSYFLGGCSSGFIDVW</u> GQGT LTVTVSS (SEQ ID NO: 4)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>SSYSY</u> GWFQQKPGQAPVTVIY <u>ESN</u> RPSDIPDR FSGSSSGNTASLTITGAQAED EADYY <u>CGN</u> <u>ADSSSGIF</u> SGTKVTVL (SEQ ID NO: 5)
[12865.15377]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FDFS</u> <u>DHGM</u> QWVRQAPGKLEYVG <u>VIDTTGRYT</u> YYAPAVKGRATISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CAKTT</u> <u>CVGGYLCNTVGSIDA</u> WGQGT LTV TVSS (SEQ ID NO: 6)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>G</u> <u>SSSY</u> YGWYQQKPGQAPVTVIY <u>DDT</u> NR PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQA EED EADYY <u>CGGYEGSSHAGIF</u> SGTKV TVL (SEQ ID NO: 7)

Anticuerpo humanizado	Secuencia de aminoácidos de V _H	Secuencia de aminoácidos de V _L
[12892.15378]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA AS <u>GFDFSSYTM</u> QWVRQAPGKGLE WVG <u>VISSTGGST</u> GYGPAVKGRAT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYY <u>CVKSISGDAWSVDGLDAWGQ</u> GTLTVSS (SEQ ID NO: 8)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>GSAY</u> GWYQQKPGQAPVTVIY <u>YNN</u> QRPSGIPD RFGSSSGNTASLTITGAQAEDADYY <u>CG</u> <u>SYDSSAVGIF</u> GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 9)
[12796.15376]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FDFFSYTM</u> QWVRQAPGKGLEWVG V <u>VISSTGGST</u> GYGPAVKGRATISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CVKSV</u> <u>SGDAWSVDGLDAW</u> GQGTLTVSS (SEQ ID NO: 10)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>GSAY</u> GWYQQKPGQAPVTVIY <u>YNN</u> QRPSDIPD RFGSSSGNTASLTITGAQAEDADYY <u>CG</u> <u>SYDSSAVGIF</u> GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 11)
[12777.15382]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FDFFSYGM</u> QWVRQAPGKGLEWVG V <u>ISGSGITT</u> LYAPAVKGRATISRDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CTRSPSI</u> <u>TDGWTYGGAWIDAW</u> GQGTLTVS S (SEQ ID NO: 12)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>DGSY</u> GWFQQKPGQAPVTVIY <u>DND</u> NRPSDIPD RFGSSSGNTASLTITGAQAEDADYY <u>CG</u> <u>NADLSGGIF</u> GSGTKVTVL (SEQ ID NO: 13)
[12760.15375]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FTFSTFN</u> MVWVRQAPGKLEYVAE <u>I</u> <u>SSDGSFT</u> WYATAVKGRATISRDNSK NTVYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CAKSDC</u>	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>ISDD</u> <u>GSYYY</u> GWFQQKPGQAPVTVIY <u>IND</u> RRPS NIPDRFGSSSGNTASLTITGAQAEDAD YY <u>CGSYDSSAGVGIF</u> GSGTKVTVL

Anticuerpo humanizado	Secuencia de aminoácidos de V _H	Secuencia de aminoácidos de V _L
	<u>SSSYGYSCIGIIDAW</u> GQGTLTVSS (SEQ ID NO: 14)	(SEQ ID NO: 15)
[13112.15380]	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>G</u> <u>FTFSSYN</u> MFWVRQAPGKGLEFVAE <u>I</u> <u>SGSNTGSRT</u> WYAPAVKGRATISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CAKSI</u> <u>YGGYCAGGYSCGVGLIDAW</u> GQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 16)	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCSGG <u>SSDY</u> YGWFFQQKPGQAPVTVIY <u>YNN</u> KRPSDIPD RFGSSSSGNTASLTITGAQAEDEADYY <u>CG</u> <u>NADSSVGVF</u> GS GTKVTVL (SEQ ID NO: 17)

* Las regiones CDR están en cursiva, subrayadas y en negrita.

Tabla 5 Secuencias de H y L-CDR de anticuerpos anti-PD-1 humanizados

Anticuerpo humanizado	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
[12819.15384]	GFTFTRY D	IGDSNKMT	CAKGSCIA C WDEAGRIDA W	GSYDGSSY	NNN	CGSYDRPETNSD YVGMF
SEQ ID NO:	18	19	20	21	22	23
[12748.15381]	GFTFSDY A	IGNDGSYT	CASDIRSRN DCSYFLGGCS SGFIDVW	SSYS	ESN	CGNADSSSGIF

Anticuerpo humanizado	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
SEQ ID NO:	24	25	26	27	28	29
[12865.15377]	GFDFSDH G	IDTTGRYT	CAKTTCVGG YLCNTVGSID AW	GSSSY	DDT	CGGYEGSSHAGI F
SEQ ID NO:	30	31	32	33	34	35
[12892.15378]	GFDFSSYT	ISSTGGST	CVKSISGDA WSVDGLDA W	GSA	YNN	CGSYDSSAVGIF
SEQ ID NO:	36	37	38	39	40	41
[12796.15376]	GFDFSSYT	ISSTGGST	CVKSVSGDA WSVDGLDA W	GSA	YNN	CGSYDSSAVGIF
SEQ ID NO:	42	43	44	45	46	47
[12777.15382]	GFDFSSY G	ISGSGITT	CTRSPSITDG WTYGGAWI DAW	DGS	DND	CGNADLSGGIF
SEQ ID NO:	48	49	50	51	52	53
[12760.1537	GFTFSTFN	ISSDGSFT	CAKSDCSSSY	ISDDGSYY	IND	CGSYDSSAGVGI

Anticuerpo humanizado	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
5]			YGYSIGIIDA W			F
SEQ ID NO:	54	55	56	57	58	59
[13112.1538 0]	GFTFSSYN	ISGSNTGSR T	CAKSIYGGYC AGGYSCGVG LIDAW	SSDY	YNN	CGNADSSVGVF
SEQ ID NO:	60	61	62	63	64	65

Todos los anticuerpos humanizados comprendían la región constante de la cadena pesada variante de LgG1 "LALA" y las secuencias de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera que se muestran a continuación.

5 Región constante de cadena pesada (SEQ ID NO: 67):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
10 REPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región constante de cadena ligera (SEQ ID NO: 68):

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTK
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

15 Ejemplo 5: Escrutinio de candidatos de anticuerpos anti-PD-1

PD-1 se expresa principalmente en la superficie de los linfocitos T activados, donde

regula negativamente la actividad de las células T. Para seleccionar los candidatos de anticuerpos anti-PD-1 más funcionales, se establecieron dos sistemas de escrutinio *in vitro* diferentes, un análisis en sangre completa de Enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) y un ensayo de reacción mixta linfocitaria unidireccional.

5 Materiales y métodos

Se escrutó inicialmente un repertorio de 69 mAb humanizados únicos en el formato de armazón IgG1-LALA, es decir, teniendo las mutaciones "LALA" descritas en el Ejemplo 4, y se clonaron y humanizaron como se describió anteriormente, para determinar la actividad funcional en el análisis en sangre completa de SEB. SEB es un súper-antígeno que se une a las moléculas del MHC de clase II y regiones específicas de V β de los receptores de células T (TCR) y dirige la estimulación no específica de las células T. Esto da como resultado la activación/proliferación de células T policlonales y la liberación de citoquinas incluyendo IL-2 e IFN- γ .

Con el fin de investigar la relevancia del análisis de SEB para el escrutinio de la actividad anti-PD-1, se investigó el nivel de expresión de PD-1 para diferentes donantes antes y después de la estimulación con SEB. Las PBMC de seis donantes diferentes se sometieron a ensayo para determinar la expresión de PD-1 mediante citometría de flujo el día 0 y el día 3 después de la estimulación con SEB. Se estableció una salida de linfocitos relevante para un análisis posterior.

Basándose en el escrutinio en los análisis en sangre completa de SEB, utilizando sangre de al menos tres donantes diferentes, se identificaron los 10 principales candidatos de anticuerpo anti-PD-1. Los candidatos de anticuerpo anti-PD-1 se titularon posteriormente para obtener curvas de dosis-respuesta para cada anticuerpo individual en comparación con los controles positivos, análogos de referencia de los anticuerpos anti-PD-1 pembrolizumab (Merck) y nivolumab (Bristol-Myers Squibb); véase el Ejemplo 2.

La funcionalidad de los 10 principales anticuerpos anti-PD-1 seleccionados se validó en un análisis *in vitro* alternativo, el ensayo de reacción mixta linfocitaria unidireccional (MLR). En este ensayo, las células dendríticas (DC) de un donante se cultivaron conjuntamente con células T CD4⁺ de otro donante para obtener estimulación específica de aloantígeno, inducida en 10-15% de todas las células T, lo que condujo a la activación/proliferación de células T y secreción de citoquinas.

Debido a un problema de estabilidad de la proteína para uno de los candidatos (12748.15381), se utilizaron secuencias alternativas de la línea germinal para este anticuerpo específico. Uno de los anticuerpos resultantes, 12748.16124, se menciona a continuación. Esta variante tiene una secuencia V_L diferente, pero la misma secuencia V_H como 12748.15381 (Tabla 1, más arriba).

Resultados

Los datos en la Figura 4 muestran claramente que la frecuencia de linfocitos que expresan PD-1 aumenta en todos los donantes sometidos a ensayo después de la estimulación con SEB. Estas observaciones confirman la relevancia de este análisis para el escrutinio de anticuerpos anti-PD-1.

La titulación de los anticuerpos anti-PD-1 más funcionales en el análisis de SEB, mostrada en las Figuras 5A-I, identificó los mejores candidatos anti-PD-1 con funcionalidad similar o superior a los análogos de anticuerpo de control positivo pembrolizumab y nivolumab. En este análisis, se estimuló sangre completa con SEB durante 48 h en presencia de los anticuerpos indicados, y se midió la secreción de IL-2 después de 48 horas mediante ELISA. Cada punto de datos representa un promedio de seis réplicas, indicando las barras el ETM.

Las Figuras 5A-H muestran los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-PD-1 humanizados. Debido a la agregación por encima de 5% para uno de los anticuerpos [12748.15381], se sometió a ensayo un marco alternativo para este anticuerpo. Los datos en la Figura 5I muestran una funcionalidad similar del anticuerpo humanizado original [12748.15381] y su variante de la línea germinal (marco) [12748.16124].

La funcionalidad de los anticuerpos anti-PD-1 se validó en un ensayo MLR unidireccional. En este ensayo, las células dendríticas y las células T $CD4^+$ (proporción 1:10) de dos donantes diferentes se cultivaron conjuntamente, y se midió la secreción de IFN- γ mediante MesoScale después de 5 días. Cada punto de datos representa un promedio de seis réplicas, indicando las barras indican el ETM. Los datos obtenidos del ensayo MLR unidireccional e ilustrados en las Figuras 6A-H muestran la misma funcionalidad y clasificación de los anticuerpos anti-PD-1 que los datos obtenidos del ensayo con SEB. Esta consistencia en los datos entre diferentes ensayos proporciona una confirmación adicional de que los anticuerpos seleccionados son funcionales.

Los anticuerpos seleccionados se originan a partir de dos diferentes familias ("bins") de epítomos principales, lo que indica que se unen a dos epítomos diferentes que no se solapan. Todos los anticuerpos anti-PD-1 mostrados pertenecen al Bin 1, excepto para los anticuerpos 12760 y 13112, que pertenecen al Bin 2. Se encontró que los anticuerpos anti-PD-1 del Bin 1 muestran la funcionalidad más alta en estos en ensayos in vitro

Ejemplo 6: Análisis de citometría de flujo de anticuerpos anti-PD-1 para determinar la actividad bloqueante del ligando PD-L1

Este ejemplo ilustra cómo se sometió a ensayo el panel de anticuerpos anti-PD-1 para determinar la actividad bloqueante del ligando PD-L1 realizando un análisis competitivo mediante citometría de flujo utilizando PD-1 expresado en la superficie celular y PD-L1 soluble marcado con fluorocromo.

Materiales y métodos

La actividad bloqueante del ligando PD-L1 se investigó en análisis celular múltiplex, en el que PD-1 humana y de cinomolgo se expresaron de manera recombinante en células CHO-S y la unión de la proteína quimera PD-L1-Fc humana marcada con R-PE (R-ficoeritrina) se analizó mediante citometría de flujo. La proteína quimera PD-L1-Fc recombinante asequible comercialmente (R&D Systems, USA) se conjugó con R-PE utilizando el Kit de Conjugación con R-Ficoeritrina Lightning-Link® (Innova Biosciences, UK). Las células CHO-S transfectadas transitoriamente para expresar PD-1 humana se mezclaron con las células CHO-S teñidas con CFSE que expresaban transitoriamente PD-1 de cinomolgo. Esta mezcla de células se incubó a continuación con 50 µl de anticuerpo anti-PD-1 a 20 µg/ml sobre hielo, seguido de la adición de 50 µl de PD-L1-Fc marcada con R-PE a aprox. 3,4 µg/ml (concentración final 16,4 nM) y posterior incubación durante 20 min adicionales (concentración final de anticuerpo anti-PD-1: 10 µg/ml). El anticuerpo unido se detectó utilizando anticuerpo anti-cadena ligera de IgG humana conjugado con APC (aloficocianina). La unión de los anticuerpos PD-L1 y anti-PD-1 se cuantificó mediante citometría de flujo detectando fluorescencia R-PE y APC, respectivamente.

Resultados

Los resultados del experimento de competición se presentan en las Figuras 7A-B y se resumen en la Tabla 6 a continuación. Todos los anticuerpos anti-PD-1 se analizaron a una concentración de anticuerpo final de 10 µg/ml (véase más arriba). Tres de los anticuerpos

sometidos a ensayo fueron capaces de inhibir la unión de PD-L1 en 83% o más, similar al anticuerpo de referencia anti-PD-1 lambrolizumab (Merck), que es el mismo que pembrolizumab y se incluyó como control positivo. Un anticuerpo (12777.13362) solo inhibió parcialmente la unión en un 69%. Un anticuerpo (13112.13208) no bloqueó la unión de PD-1.

- 5 La unión de PD-L1 a células que expresan PD-1 en presencia del anticuerpo anti-VEGFR2 de control negativo ramucirumab (Genentech) se ajustó a 0%.

Tabla 6 Inhibición de unión a PD-L1 en presencia de anticuerpos anti-PD-1

Anticuerpo	% de inhibición de la unión de PD-L1
12819.13367	87%
12748.13354	86%
12892.13195	88%
12777.13362	69%
13112.13208	5%
Lambrolizumab (control pos.)	88%
Ramucirumab (control neg.)	ajustado a 0%

- Las variantes humanizadas mostradas en la Tabla 6 tienen las mismas secuencias de aminoácidos que las de la Tabla 1 que comparten los primeros 5 dígitos en sus nombres, excepto que las variantes de la Tabla 1 tienen residuos de aminoácidos "SY" en el extremo N-terminal de la cadena ligera. En algunas realizaciones, el dipéptido SY mejora el procesamiento del péptido señal durante la expresión de la cadena ligera del anticuerpo. Se espera que las variantes en las Tablas 1 y 6 tengan propiedades funcionales idénticas.

15 **Ejemplo 7: Medición de las afinidades del anticuerpo PD-1 contra antígeno EDC de PD-1 humana y de cinomolgo**

Este ejemplo demuestra que la mayoría de los anticuerpos anti-PD-1 muestran una alta afinidad picomolar (pM) y una buena reactividad cruzada contra los dominios extracelulares (ECD) de PD-1 tanto humanos como de cinomolgus.

Materiales y métodos

El análisis de unión cinética del repertorio de anticuerpo anti-PD-1 purificado se realizó en un biosensor de resonancia de plasmón superficial (SPR) XPR-36 (Bio-Rad, EE. UU.). Los antígenos contra ECD de PD-1 humanas o de cinomolgos etiquetados con His se adquirieron de Acro Biosystems, Reino Unido. La cinética de unión se midió en condiciones de antígeno monovalente inmovilizando anticuerpos anti-PD-1 y manteniendo el antígeno PD-1 monovalente en solución como se describió previamente (Canziani y col., *Anal Biochem* **325(2)**:301-307 (2004)). Se aplicó la densidad de anticuerpos anti-PD-1 más baja posible para evitar la unión inespecífica y la limitación del transporte en masa. Para medir la cinética de anticuerpos, los anticuerpos anti-PD-1 se ajustaron a una concentración de 1,0 µg/ml y se capturaron en superficies con anti-Fc de IgG humana generados por la inmovilización de aproximadamente 1.000 UR de un anticuerpo monoclonal anti-Fc humano (Biacore, Dinamarca). Se sometieron a ensayo anticuerpos anti-PD-1 para determinar la unión a ECD de PD-1 humana o de cinomolgo en un intervalo de concentración 3 veces mayor de 25 nM a 0,31 nM seguido de la regeneración de las superficies con tampón de regeneración MgCl₂ 3 M (Biacore, Dinamarca). Se empleó un caudal elevado de 20 µl/min, un tiempo de asociación de 3,33 min y un tiempo de disociación entre 1,5 horas y 2,75 horas. Las respuestas de unión registradas se ajustaron a un modelo simple de unión de Langmuir 1:1 para el cálculo de las constantes de velocidad de asociación (k_{on} o k_a), velocidad de disociación (k_{off} o k_d) y afinidad (K_D) utilizando doble referencia.

Resultados

Las cinéticas de unión se tabulan en la Tabla 7 a continuación, que ilustra que el panel de anticuerpos anti-PD-1 se une a PD-1 con afinidades muy altas en el intervalo pM. Todos los anticuerpos reconocen PD-1 humana con mayor afinidad que los análogos de nivolumab y pembrolizumab. El anticuerpo de mayor afinidad [12819.15384] se une a PD-1 humana con una K_D de 20 pM.

Tabla 7 Cinética de unión de anticuerpos anti-PD-1 a ECD de PD-1 humana o de cinomolgo medida por Resonancia Plasmón Superficial (SPR)

Anticuerpo	ECD de PD-1	k_{on} (M⁻¹ s⁻¹)		Error k_{on}	k_{off} (s⁻¹)		Error k_{off}	K_D (pM)
[12819.15384]	Humano	1,1E+06	±	1,7E+03	2,3E-05	±	1,3E-07	20
[12819.15384]	Cynomolgus	9,7E+05	±	1,6E+03	4,5E-06	±	1,5E-07	5
[12748.15381]	Humano	3,2E+06	±	1,0E+04	1,7E-04	±	7,1E-07	54
[12748.15381]	Cynomolgus	4,6E+06	±	1,6E+04	4,7E-04	±	9,1E-07	101
[12748.16124]	Humano	3,4E+06	±	8,2E+03	1,6E-04	±	5,9E-07	47
[12748.16124]	Cynomolgus	4,8E+06	±	1,8E+04	3,9E-04	±	9,8E-07	81
[12865.15377]	Humano	4,2E+05	±	2,2E+03	2,3E-04	±	5,5E-07	558
[12865.15377]	Cynomolgus	5,1E+05	±	2,2E+03	3,8E-04	±	7,3E-07	738
[12892.15378]	Humano	4,6E+05	±	2,3E+03	3,4E-04	±	7,1E-07	737
[12892.15378]	Cynomolgus	2,9E+05	±	1,0E+10	6,9E-04	±	8,5E-01	2340
[12796.15376]	Humano	7,1E+05	±	3,9E+03	3,8E-04	±	1,1E-06	542
[12796.15376]	Cynomolgus	3,2E+05	±	3,5E+03	7,0E-04	±	2,5E-06	2220
[12777.15382]	Humano	2,4E+05	±	1,7E+03	8,0E-05	±	4,0E-06	337
[12777.15382]	Cynomolgus	2,5E+05	±	7,3E+03	1,7E-04	±	3,5E-06	681
[12760.15375]	Humano	1,2E+06	±	3,4E+03	1,4E-04	±	6,5E-07	112
[12760.15375]	Cynomolgus	1,0E+06	±	1,7E+04	7,2E-03	±	5,8E-05	6940

Anticuerpo	ECD de PD-1	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)		Error k_{on}	k_{off} (s ⁻¹)		Error k_{off}	K_D (pM)
[13112.15380]	Humano	1,2E+06	±	4,8E+03	6,9E-05	±	7,4E-07	60
[13112.15380]	Cynomolgus	2,5E+06	±	1,5E+04	1,1E-03	±	3,9E-06	452
análogo de nivolumab	Humano	1,4E+06	±	9,2E+03	1,1E-03	±	4,1E-06	758
análogo de nivolumab	Cynomolgus	1,4E+06	±	8,5E+03	7,7E-04	±	2,9E-06	542
análogo de pembrolizumab	Humano	2,4E+06	±	2,7E+04	2,1E-03	±	1,1E-05	852
análogo de pembrolizumab	Cynomolgus	1,7E+06	±	1,0E+04	3,3E-04	±	9,5E-07	190

Ejemplo 8: Establecimiento de familias ("binning") de epítomos de anticuerpos anti-PD-1

Este ejemplo ilustra cómo los anticuerpos PD-1 se agruparon en familias de epítomos basándose en patrones de competición emparejados. Los anticuerpos que pertenecen a diferentes ubicaciones de epítomos reconocen diferentes epítomos en ECD de PD-1.

Métodos

La investigación de la competición de anticuerpos emparejados se realizó mediante análisis de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) utilizando un Microscopio de Flujo Continuo (CFM) (Wasatch Microfluidics, EE.UU.) combinado con un aparato IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, Países Bajos). El análisis de imágenes de resonancia de Plasmón superficial se realizó en sensores E2S SensEye® SPR (Ssens BV, Países Bajos). Se diluyeron un total de diez anticuerpos anti-PD-1 (humanos, IgG1) a 10 pg/ml en tampón de acetato sódico 50 mM, pH 4,5. Los anticuerpos se aplicaron en un E2S SensEye® y se conjugaron durante 15 minutos utilizando un Microspotter de flujo continuo. Después de la aplicación, el SensEye® se colocó en el biosensor IBIS MX96 y se desactivó con etanolamina 1 M, pH 8,5 durante 10 minutos. Después de la preparación del sensor, el análisis de competición de anticuerpos se realizó utilizando un ensayo sándwich clásico. El

antígeno de ECD de PD-1 monovalente (Sino Biological, China) se diluyó en tampón de migración HBS-EP y se inyectó a una concentración 50 nM y se capturó mediante la matriz conjugada de anticuerpos anti-PD-1. A continuación, se realizaron inyecciones individuales de cada uno de los diez anticuerpos PD-1 diluidos a 100 nM en tampón de migración HBS-EP para establecer los patrones de competición de anticuerpos. Después de cada ciclo de competición, la superficie del sensor se regeneró con tampón de Glicina HCl 10 mM, pH 2,0.

Resultados

El patrón de competición de diez anticuerpos anti-PD-1 se presenta en la Figura 8. No se encontró que 12866 y 12807 tuvieran actividad funcional en análisis basados en células, pero se incluyeron debido a que reconocen epítomos distintos. Se descubrió que los anticuerpos anti-PD-1 funcionales sometidos a ensayo se unen a dos familias de epítomos que no se solapan. Todos los anticuerpos funcionales pertenecientes al Bin 1 de epítomos se bloquearon de manera cruzada entre sí e incluyeron análogo de nivolumab ("Nivo"), análogo de pembrolizumab ("Pembro"), 12819, 12892, 12865 y 12777. Se descubrió que estos anticuerpos bloquean significativamente la unión de PD-L1 y PD-L2. Se encontró que 12760 y 13112 se unen a un Bin 2 de epítomos separado debido a que se bloquean de manera cruzada uno con otro, pero no bloquean la unión de ninguno de los anticuerpos del Bin 1 de epítomos. por consiguiente 12760 y 13112 se unen probablemente a un sitio diferente en PD-1 que no se solapa con el sitio de unión al ligando de PD-L1 y PD-L2.

Los anticuerpos funcionales de bloqueo cruzado 12819, 12865, 12892, 12777, nivolumab y pembrolizumab que pertenecen al Bin 1 de epítomos podrían subdividirse adicionalmente en cuatro subfamilias basándose en la competición con 12866 y 12807 (Figura 8). 12819 (Bin 1C) fue el único anticuerpo que bloqueó la unión de 12866 y 12807, mientras que nivolumab (Bin 1D) solo bloqueó 12866 y pembrolizumab (Bin 1F) solo bloqueó 12807. El grupo de anticuerpos pertenecientes al Bin 1E (12865, 12892 y 12777) fue único ya que no bloqueó la unión de 12866 o 12807.

Finalmente, 12866 (Bin 1A) y 12807 (Bin 1B) unieron familias de epítomos únicos. 12866 fue bloqueado por 12819 y nivolumab pero no por otros anticuerpos anti-PD-1, y 12807 fue bloqueado por 12819 y pembrolizumab, pero no por otros anticuerpos anti-PD-1.

Ejemplo 9: Medición de la reactividad cruzada del anticuerpo PD-1 contra el antígeno ECD de PD-1 de ratón y rata

Este ejemplo demuestra que el anticuerpo anti-PD-1 12819.15384 reacciona de manera cruzada fuertemente con PD-1 de ratón pero no se une a PD-1 de rata.

Materiales y métodos

Se adquirieron ECD de PD-1 de ratón y rata etiquetados con His de Sino Biologicals.

- 5 El análisis de unión cinética se realizó como se describe en el Ejemplo 7.

Resultados

- Las cinéticas de unión se tabulan en la Tabla 8 a continuación. El anticuerpo anti-PD-1 12819.15384 se une a PD-1 de ratón con una K_D de 809 pM pero no reconoce PD-1 de rata. La afinidad por el ECD de PD-1 humana fue similar a la medida en el Ejemplo 7. El anticuerpo 12865.17150 no se unió a PD-1 de ratón o rata. Ninguno de los análogos de referencia de nivolumab y pembrolizumab reaccionaron de forma cruzada con PD-1 de ratón o rata (datos no mostrados).
- 10

Tabla 8 Cinética de unión del anticuerpo PD-1 12819.15384 a ECD de PD-1 humana, de ratón o rata medida mediante Resonancia de Plasmón Superficial (SPR)

Anticuerpo	ECD de PD-1	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)		Error k_{on}	k_{off} (s ⁻¹)		Error k_{off}	K_D (pM)
[12819.15384]	humano	3.26E+05	±	3E+02	8.85E-06	±	5E-08	28
[12819.15384]	ratón	3,71E+04	±	5E+01	3,04E-05	±	7E-09	809
[12819.15384]	rata	S.N.*	±		S.N.	±		S.N.

- 15 *SN: Sin unión.

Ejemplo 10: Análisis de la actividad de bloqueo del ligando PD-L1 y PD-L2 de los mAb PD-1

- Este ejemplo ilustra cómo se analizó el panel de anticuerpos anti-PD-1 para determinar la actividad de bloqueo del ligando PD-L1 o PD-L2 realizando un ensayo de competición utilizando análisis de Interferometría Bio-Layer.
- 20

Materiales y métodos

La investigación de la actividad de bloqueo del ligando PD-L1 o PD-L2 se realizó mediante análisis de Interferometría Bio-Layer (BLI) utilizando un instrumento Octet QK384 (Fortebio, EE.UU.). La proteína de fusión Fc de PD-1 humana disponible comercialmente (Sino Biological) a una concentración de 5 g/ml se capturó sobre chips sensores anti-Fc humano (Fortebio, EE.UU.) y los sitios anti-Fc residuales se bloquearon con anticuerpo de control negativo Herceptin®. A continuación, la superficie recubierta con antígeno se saturó con anticuerpo anti-PD-1 a una concentración de 10 µg/ml. Después de la saturación de PD-1 con anticuerpo anti-PD-1, se evaluó la actividad de bloqueo de ligando de PD-L1 o PD-L2 mediante la incubación con proteínas de fusión humanas PD-L1 o PD-L2 Fc (Sino Biological) analizadas a 5 µg/ml.

Resultados

El resultado del análisis de competición se presenta en la Tabla 9 a continuación. Todos los anticuerpos bloquearon por completo la unión del ligando PD-L1 o PD-L2, excepto el anticuerpo 12760.13169, que no mostró bloqueo significativo de PD-L1 o PD-L2 (26% y 36%, respectivamente), y 13112.13208, que no mostró bloqueo de PD-L1 y bloqueo débil de PD-L2 (27% y 53%, respectivamente). Los resultados estuvieron de acuerdo con el análisis de establecimiento de familias de epítomos (Ejemplo 8) y el análisis de mapeo de epítomos (Ejemplo 11), que mostró que todos los anticuerpos excepto 12760 y 13112 se unen a epítomos solapantes que se mapean en sitio de unión PD-L1 y PD-L2 en PD-1, mientras que los anticuerpos 12760 y 13112 se unen a un sitio PD-1 por separado y no compiten significativamente de forma cruzada con PD-L1 y PD-L2.

Tabla 9 Inhibición de PD-L1 y PD-L2 después de la saturación de anticuerpos anti-PD-1

mAb	Ligando	% Bloqueo
12748.13354	PD-L1-Fc	97
12748.13354	PD-L2-Fc	96
12760.13169	PD-L1-Fc	44
12760.13169	PD-L2-Fc	26
12777.13362	PD-L1-Fc	93
12777.13362	PD-L2-Fc	90
12796.13173	PD-L1-Fc	99

12796.13173	PD-L2-Fc	92
12819.13367	PD-L1-Fc	94
12819.13367	PD-L2-Fc	94
12865.13185	PD-L1-Fc	98
12865.13185	PD-L2-Fc	94
12892.13195	PD-L1-Fc	88
12892.13195	PD-L2-Fc	77
13112.13208	PD-L1-Fc	53
13112.13208	PD-L2-Fc	27
análogo de nivolumab	PD-L1-Fc	100
análogo de nivolumab	PD-L2-Fc	98
análogo de pembrolizumab	PD-L1-Fc	100
análogo de pembrolizumab	PD-L2-Fc	99
	Bloqueo de ligando no significativo	
50 - 70	Bloqueo de ligando intermedio	
70 - 90	Bloqueo de ligando intermedio	
90 - 100	Bloqueo de ligando completo	

Ejemplo 11: Mapeo de epítomos de anticuerpos anti-PD-1 mediante mutagénesis de PD-1

Los epítomos de anticuerpos generalmente se pueden caracterizar como epítomos lineales (también denominados epítomos continuos) o epítomos conformacionales (también denominados epítomos discontinuos). Si bien los epítomos lineales se definen basándose en una única secuencia de aminoácidos continua, los epítomos conformacionales pueden consistir en muchas secuencias lineales discontinuas más pequeñas o residuos de contacto único. Una colección de residuos de contacto que se agrupan en la interfaz proteica intermolecular entre el anticuerpo y el antígeno también se denomina punto caliente o epítomo central (Moreira et al., *Proteins* **68(4)**:803-12 (2007)). Ahora se reconoce ampliamente que la mayoría de los epítomos de células B son de naturaleza discontinua

(Sivalingam y Shepherd, *Mol Immunol.* **51(3-4)**: 304-92012 (2012), Kringelum y col., *Mol Immunol.* **53(1-2)**:24-34 (2013)) abarcando el epítipo medio 15-22 residuos de aminoácido de los cuales 2-5 aminoácidos contribuyen con la mayor parte de la energía de enlace (Sivalingam y Shepherd, más arriba).

- 5 Al clasificar la afinidad de unión a 11 diferentes mutantes de PD-1, este ejemplo ilustra cómo los epítopos de unión de los anticuerpos 12819 y 12865 se pueden dividir en epítopos y puntos de calientes lineales que son distintos de los epítopos reconocidos por nivolumab y pembrolizumab.

Métodos

- 10 El receptor de PD-1 humana consiste en un dominio extracelular de 268 aminoácidos (residuos 21-288). El dominio extracelular abarca los aminoácidos 21-170 seguido de un dominio transmembrana (residuos 171-191) y un dominio citoplásmico (residuos 192-288). PD-1 pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y está compuesta por un sándwich β de dos capas formado por interacciones de 8 cadenas β antiparalelas dispuestas en dos
- 15 láminas β con hebras β de GFCC' en un lado y hebras β ABED en el lado opuesto. Las dos láminas β se estabilizan mediante un enlace disulfuro entre los residuos C54-C123. Está disponible una estructura cristalina para PD-1 humana: complejo PD-L1 humano (PDB 4ZQK), pero el bucle C'D entre las cadenas β C' y D no estaba estructurado y falta, así como parte de la secuencia C-terminal después de residuo 146 (PDB 4ZQK, Zak y col., *Structure*
- 20 **23(12)**:2341-2348 (2015)). Recientemente, se ha publicado una estructura cristalina del complejo PD-1 humana:pembrolizumab (PDB 5JXE, Na y col., *Cell Res.* 2016 [Publicación electrónica antes de impresión], PMID:27325296). En esta estructura, el bucle C'D está mucho más ordenado y se mostró que los residuos de contacto importantes para la unión del pembrolizumab se agruparon en un epítipo central en este bucle. No está disponible la
- 25 estructura cristalina del complejo PD-1 humana:PD-L2 humano. Una estructura de RMN de PD-1 humana en solución muestra una alta similitud estructural con la estructura cristalina de PDB 4ZQK (PDB 2M2D, Cheng y col., *J Biol Chem* **288(17)**:11771-85 (2013)). La PD-1 humana se une a ligandos PD-L1 o PD-L2 humanos con una estequiometría 1:1 y la unión se produce principalmente en sitios de unión solapantes mediados por la lámina β de GFCC'
- 30 (Cheng y col., *J Biol Chem* **288(17)**:11771-11785 (2013)) (Figura 9, paneles A y B). PD-L1 humano se une a PD-1 humana a través de los residuos de contacto V64, N66, Y68 situados en la hebra β de C y G124, 1126, L128, A132, 1134 y E136 ubicados en las hebras β de F y

G (Zak y col., *Structure* **23(12)**:2341-8 (2015)). PD-L1 y PD-L2 humanos se unen a PD-1 humana con K_D de 8 μ M y 2 μ M, respectivamente (Cheng et al., más arriba).

La secuencia de proteína de PD-1 humana se descargó de Uniprot (Núm. de acceso Q15116, la secuencia de aminoácidos se representa en SEQ ID NO: 1). La secuencia de proteína de *Macaca fascicularis* completa se descargó de Uniprot (Núm. de acceso B0LAJ3_MACFA (SEQ ID NO: 89)). Las secuencias de proteína completas de PD-1 de *Gallus gallus*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* se descargaron de NCBI (XP_422723. (SEQ ID NO: 90), NP_032824.1 (SEQ ID NO: 91) y XP_006245633.1 (SEQ ID. NO: 92), respectivamente). Las identidades de secuencia de las diferentes secuencias de aminoácidos extracelulares de PD-1 en comparación con PD-1 humana se muestran en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 10 Comparación de secuencia de ECD de PD-1 entre especies

	Diferencias de Aminoácidos	% de Identidad de Secuencia
ECD de PD-1 de <i>Macaca fascicularis</i>	6	96,0
ECD de PD-1 de <i>Rattus norvegicus</i>	50	66,7
ECD de PD-1 de <i>Mus musculus</i>	57	62,0
ECD de PD-1 de <i>Gallus gallus</i>	73	51,3

Se construyó un modelo molecular de PD-1 humana combinando información estructural de la estructura cristalina del complejo PD-1 humana:PD-L1 humano determinado a una resolución de 2,45 Å (PDB 4ZQK) y una estructura de RMN de PD-1 humana de APO (PDB 2M2D). La estructura PDB 4ZQK se utilizó como la base para el modelo con el bucle de CD perdido y la porción C-terminal de PD-1 proporcionada a partir de la estructura de RMN. A continuación, se destacaron los residuos de aminoácidos expuestos en la superficie y se diseñaron 83 sustituciones de alanina individuales en residuos expuestos en superficie en ECD de PD-1 humana (barrido de alanina) y 5 posiciones de residuos expuestos que difirieron entre PD-1 humana, de ratón y de rata. para rastrear residuos de PD-1.

Para mapear epítomos de anticuerpos lineales en el contexto de la estructura de PD-1 humana nativa, se generaron 23 proteínas quiméricas donde 10 aminoácidos en la

secuencia de ECD de PD-1 humana se intercambiaron secuencialmente por secuencia de pollo en segmentos que se solapaban con 5 amino ácidos. Se realizaron intercambios de secuencias en el dominio extracelular de PD-1 humana que abarcaban los aminoácidos 31-146, ya que la secuencia de la proteínas de Gallus gallus fuera de este segmento no se alineó bien con PD-1 humana y se omitió.

El ADNc de PD-1 que codifica el dominio extracelular de PD-1 humana se sintetizó y se clonó en un vector que contenía el promotor de CMV y la secuencia de Fc de IgG₁ humana (residuos P101-K330) dando como resultado la fusión de Fc de IgG₁ C-terminalmente al ECD de PD-1 clonado. Las construcciones de fusión de Fc de PD-1 humanos mutados se generaron mediante técnicas de ingeniería genética y PCR convencionales y la proteína se expresó transitoriamente en 2 ml de cultivo utilizando un sistema de expresión ExpiCHO™. Las construcciones de fusión de Fc de PD-1 humana se recogieron después de 9 días y los sobrenadantes se sometieron a ensayo para determinar la afinidad de unión a los Fab anti-PD-1 por medio de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). Los sobrenadantes de cultivo que contenían proteínas de fusión de PD-1 se inmovilizaron en un SensEye® (Ssens BV, Países Bajos) para G-a-hu-IgG Fc durante 15 minutos utilizando un Microspotter de Flujo Continuo (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, EE.UU.). Después de la aplicación, el SensEye® se colocó en un biosensor IBIS MX96 y las proteínas capturadas se fijaron a la superficie con el kit FixIT (Ssens BV, Países Bajos). El análisis cinético se realizó aplicando la denominada serie de titulación cinética (Karlsson R. 2006), donde se inyectaron fragmentos Fab monoméricos de los anticuerpos de la invención a concentraciones crecientes de 1 nM a 50 nM sin aplicación de etapas de regeneración de superficie después de cada inyección de antígeno. La asociación de Fab se realizó durante 15 minutos y la disociación del antígeno se realizó durante 30 minutos. Las respuestas de unión registradas se ajustaron a un modelo simple de unión Langmuir 1:1 con el soporte lógico Scrubber 2 para el cálculo de las constantes de velocidad de asociación (k_{on} o k_a), velocidad de disociación (k_{off} o k_d) y de afinidad (K_D).

Resultados

Se evaluaron las afinidades de unión de los Fab anti-PD-1 12819.17149 y 12865.17150 y los análogos de referencia nivolumab y pembrolizumab. 12819.17149 y 12865.17150 tienen secuencias de aminoácidos de VH y VL idénticas a 12819.15384 y 12865.15377, respectivamente, pero se identifican por diferentes números de 10 dígitos

porque las secuencias de cadena pesada y ligera de cada una de las dos primeras variantes se expresaron conjuntamente en el mismo plásmido en lugar de en plásmidos separados en las células anfitrionas. El Fab 13112.15380 y Herceptin® que no bloquean los ligandos PD-L1 y PD-L2 se incluyeron como controles.

5 Los 111 mutantes de PD-1 sometidos a ensayo se expresaron bien. Solo tres construcciones quiméricas no se unieron a ninguno de los anticuerpos sometidos a ensayo, lo que sugiere que las mutaciones introducidas en estas tres construcciones presumiblemente dieron como resultado perturbaciones conformacionales mayores que afectaron a la unión de todos los anticuerpos PD-1 sometidos a ensayo. El cambio en la
10 afinidad de unión de los anticuerpos Fab que se unen a las construcciones de PD-1 mutadas en comparación con el tipo salvaje se expresaron como la razón de K_D mutante/ K_D de tipo salvaje (afinidad de unión normalizada). En la Tabla 11 siguiente se muestra una visión general de la exploración del epítipo lineal realizada mediante la inserción de secuencias de *Gallus gallus* de 10 aminoácidos en el ECD de PD-1 humana. Se empleó al menos una
15 reducción de afinidad 5 veces mayor como criterio de corte para detectar la reducción de la afinidad de unión a las construcciones de PD-1 mutada. En algunos casos, no se pudo detectar unión a anticuerpos específicos. Estas construcciones se enumeraron como S.U. (sin unión).

También se mapearon los residuos de contacto único realizando 83 sustituciones de
20 alanina o 5 retromutaciones en rata (Tabla 12 a continuación).

Una descripción de los epítopos lineales o residuos de contacto identificados para anticuerpos sometidos a ensayo se presenta en la Tabla 13. En la Figura 9 se muestra una ilustración de los epítopos de unión mapeados mostrados como gráficos de densidad en la estructura de ECD de PD-1 humana.

25 El análisis mostró que los epítopos de unión de los anticuerpos anti-PD-1 de 12819 y 12865 eran claramente distintos en comparación con los anticuerpos de referencia nivolumab y pembrolizumab (Tablas 11-13, Figura 9). El epítipo central de pembrolizumab (Figura 9, panel C) se localizó en la hebra β de C' y en el bucle C'-D. También se encontraron residuos de contacto/epítopos lineales en las hebras β de C y F, donde también
30 hay residuos de contacto para PD-L1. El epítipo central de nivolumab (Figura 9, panel D) estaba presente en el extremo de la hebra β de F y en la hebra β de G completa que cubre algunos de los residuos de contacto de PD-1 referidos utilizados por PD-L1 humana. Los

epítopos centrales de 12819 y 12865 (Figura 9, paneles E y F) se localizaron en las hebras β de F y G cubriendo más área que nivolumab y solapándose con todos los residuos de contacto referidos para PD-L1 humana en esta región. 12865 también fue muy sensible a las mutaciones en los residuos 69-75. 12819 también compartió un residuo de contacto con pembrolizumab (V64) en la hebra β de C que también se ha informado que es un residuo de contacto para PD-L1 humana. Tanto 12819 como 12865 comparten epítopos lineales que se mapean en las hebras β de C y C' y parte del bucle CD. Además del residuo V64, no se compartieron otros residuos de contacto entre los anticuerpos sometidos a ensayo. El anticuerpo 13112 no bloqueante del ligando se mostró mediante barrido de alanina para mapear una región distante del sitio de bloqueo del ligando PD-L1 y PD-L2 (Figura 9, panel G).

En resumen, este ejemplo ilustra que aunque 12819, 12865, nivolumab y pembrolizumab se unen a epítopos solapantes en PD-1 humana que pueden bloquear la unión de ligandos PD-L1 y PD-L2, cada anticuerpo tiene un epítipo de unión distinto como se evidenciado a partir del análisis de unión competitiva (agrupación de epítopos, Ejemplo 8) y se muestra a nivel molecular mapeando epítopos lineales individuales y residuos de contacto con un panel de 111 mutantes de PD-1 como se resume en la Tabla 13. 12819 es también el único anticuerpo en el panel anti-PD-1 investigado que reacciona de forma cruzada con ECD de PD-1 de ratón (K_D de 809 pM, Ejemplo 9), destacando que el epítipo de unión de este anticuerpo es único en comparación con los otros anticuerpos PD-1 sometidos a ensayo.

Tabla 11 Análisis de afinidad de unión para anticuerpos Fab que se unen a construcciones de ECD de PD-1 quiméricas con segmentos* de secuencia de Gallus gallus insertados

Núm. Construcción quimérica	Región barrida de PD-1 hu	Región Mutada de PD-1 hu	Mutaciones de Gallus gallus introducidas	12819.17149	12865.17150	nivolumab	pembrolizumab	13112.15380
1	31-40	AA 37-38	F37L;S38F	1,2	0,6	0,4	0,9	0.4
2	36-45	AA 37-45	F37L;S38F;L41T;V43T;V44R;T45P	2,3	0,7	0,9	0,5	1.0
3	41-50	AA 41-49	L41T;V43T;V44R;T45P;E46A;D48S; N49S	1,3	0,6	0,5	0,6	0.7
4	46-55	AA 46-55	E46A;D48S;N49S;T53I;S55N	0,3	0,6	0,5	0,6	0.6
5	51-60	AA 53-59	T53I;S55N;S56I;T59S	1,2	0,9	0,8	0,9	2.5
6	56-65	AA 56-64	F56I;T59S;E61L;S62E;V64N	7,1	0,2	0,9	12,0	0.8
8	66-75	AA 69-75	R69Q;M70K;S71T;P72N;S73N; N74S;Q75N	6,4	S.U.	1,2	0,9	1.6
10	76-85	AA 76-85	T76P;D77Q;L79I;A81G;F82I; P83IE84R;D85N	33,7	13,8	0,8	S.U.	1.0
11	81-90	AA 81-90	A81G;F82I;P83IE84R;D85N;R86I; S87P;P89K;G90K	17,7	5,4	2,0	S.U.	0.8
12	86-95	AA 86-95	R86I;S87P;P89K;G90K;Q91M;D92E; R94K; F95Y	2,2	0,6	0,5	S.U.	0.6
15	101-110	AA 103-110	G103T;R104P;D105V;H107K; S109E;V110I	1,3	0,8	0,9	0,6	0.9
16	106-115	AA 107-115	H107K;S109E;V110I;V111L;R112N; A113L; R114H R115Q	3,6	0,4	0,6	0,7	0.7

17	111-120	AA 111-120	V111L;R112N;A113L;R114H R115Q;T120F	0,2	0,5	0,4	0,7	0.7
18	116-125	AA 120-125	T120F;L122Y;A125L	3,8	4,6	2,7	8,8	1.5
19	121-130	AA 122-130	L122Y;A125L;S127T;L128F;A129S; P130R	175,0	S.U.	0,8	2,3	0.8
20	126-135	AA 127-135	S127T;L128F;A129S;P130R;K131S; A132D;Q133K;I134VK135V	S.U.	S.U.	S.U.	3,7	0.6
21	131-140	AA 131-140	K131S;A132D;Q133K;I134VK135V; L138S; R139H;A140S	S.U.	S.U.	1,0	3,1	0.5
22	136-145	AA 138-143	L138S;R139H;A140S;E141Q;R143V	1,9	1,0	0,5	0,8	1.0
23	141-146	AA 141-143	E141Q;R143V	1,7	1,0	0,5	1,1	1.5
			KD ECD PD-1 Hu tipo salvaje (nM)	2,68E-11	3,38E-09	5,67E-09	6,08E-09	1.24E-09
	Mutantes quiméricos cambio de K_D < 5 veces							
5-10	Mutantes quiméricos cambio de K_D 5-10 veces							
10-50	Mutantes quiméricos cambio de K_D 10 - 50 veces							
50-1000	Mutantes quiméricos cambio de K_D 50 - 1000 veces							
S.U.	Sin unión de mutantes quiméricos							

*Se enumera la unión normalizada expresada como K_D del mutante/ K_D del tipo salvaje

Tabla 12 Afinidad de unión del anticuerpo Fab a residuos de ECD de PD-1 humana barridos con alanina*

Mutación	12819. 17149	12865. 17150	nivolumab	pembrolizumab	13112. 15380
P21A	2,1	1,0	0,5	0,6	1,1
G22A	1,0	0,9	0,6	0,8	1,0
D26A	1,1	0,8	1,7	0,7	1,2
S27A	0,8	0,8	2,7	0,8	1,1
D29A	1,0	0,9	1,7	0,7	1,0
R30A	1,2	1,2	1,9	1,3	1,0
P31A	1,1	1,0	2,6	1,0	1,1
N33A	1,0	1,1	0,8	0,8	1,0
T36A	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9
L42A	1,3	0,5	0,3	0,2	2,2
V44A	1,4	0,8	0,5	0,3	9,9
G47A	1,6	0,5	0,2	0,2	0,6
D48A	1,0	0,6	0,6	0,4	2,4
N49A	1,1	0,7	0,5	0,5	1,0
A50G	1,4	0,6	0,5	0,4	1,7
F56A	1,5	0,5	1,7	0,6	0,8
S57A	1,2	1,0	0,9	0,9	1,1
N58A	1,3	0,7	1,9	0,7	1,0
T59A	0,9	1,0	1,3	0,3	0,9
S60A	1,8	0,6	1,5	0,7	1,0
E61A	1,2	1,1	0,5	0,3	1,0
N66A	2,2	2,1	0,8	201,3	1,0
Y68A	2,2	1,4	0,2	0,2	0,8
S71A	0,9	0,9	0,6	0,6	0,9

Mutación	12819. 17149	12865. 17150	nivolumab	pembrolizumab	13112. 15380
P72A	1,1	1,8	0,9	0,8	1,0
S73A	0,9	0,5	0,9	0,7	0,9
Q75A	1,0	0,5	1,0	0,8	0,9
T76A	1,4	0,3	1,2	0,9	1,2
D77A	2,8	0,3	1,0	134,2	1,0
K78A	2,6	0,7	1,0	268,5	1,1
A80G	1,2	0,4	1,1	0,8	1,0
P83A	1,5	0,8	0,9	S.U.	0,9
E84A	1,3	1,0	0,8	1,3	1,0
D85A	2,5	1,6	0,6	S.U.	0,9
R86A	1,1	0,7	0,4	0,3	0,9
S87A	1,3	0,9	0,8	107,4	1,0
Q88A	1,4	1,4	0,8	0,2	0,9
P89A	1,1	0,9	1,1	S.U.	0,9
G90A	1,0	0,8	1,0	671,1	1,0
Q91A	0,8	1,0	1,0	0,7	1,0
D92A	1,2	0,8	1,0	335,6	0,9
C93A	1,2	0,9	1,1	1,2	1,1
R96A	1,0	0,8	0,9	0,5	1,0
T98A	1,1	0,9	0,8	0,6	1,0
P101A	1,1	1,0	0,6	0,5	0,9
N102A	1,5	0,6	0,2	0,3	0,7
G103A	1,1	0,8	0,5	0,5	0,9
R104A	1,0	0,8	0,6	0,4	0,7
R112A	0,7	0,9	0,8	0,6	0,9
R114A	0,8	0,8	0,7	0,6	0,9

Mutación	12819. 17149	12865. 17150	nivolumab	pembrolizumab	13112. 15380
N116A	1,4	0,8	0,6	0,6	0,9
G119A	1,0	0,4	0,5	0,5	1,0
G124A	0,5	4,0	0,3	0,6	1,0
L128A	17,1	2,1	1,5	335,6	0,9
P130A	105,1	0,5	2,6	0,6	0,9
K131A	S.U.	S.U.	1,0	1,6	0,9
A132G	53,4	1,4	0,9	0,5	1,0
Q133A	0,7	1,4	1,2	0,6	0,9
K135A	4,2	1,1	0,7	1,4	1,2
E136A	0,8	S.U.	0,9	0,9	1,0
L138A	1,0	1,1	1,0	1,0	1,2
R143A	0,9	0,7	0,7	0,5	1,0
T145A	1,1	0,7	0,9	0,5	82,4
E146A	1,2	1,0	1,0	0,9	1,0
R147A	0,7	1,0	0,8	0,7	0,7
R148A	0,3	1,0	0,8	0,8	1,1
A149G	0,8	1,0	0,8	0,8	1,0
E150A	1,0	1,0	0,7	0,7	1,0
P152A	1,4	0,9	0,6	0,6	1,0
T153A	0,9	1,0	0,9	0,9	1,0
A154G	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0
H155A	1,1	1,0	1,3	1,2	1,0
P156A	1,0	1,1	2,2	1,2	1,5
S157A	0,9	1,0	2,2	1,8	1,0
P158A	1,2	0,9	0,9	0,9	1,0
S159A	1,1	0,8	0,7	0,7	0,9

Mutación	12819. 17149	12865. 17150	nivolumab	pembrolizumab	13112. 15380
P160A	1,0	0,8	0,9	0,7	1,0
R161A	0,9	1,1	1,0	1,1	1,1
P162A	1,3	1,1	1,0	1,0	1,1
A163G	1,0	1,1	0,8	0,8	1,1
G164A	1,1	0,9	0,5	0,6	1,0
Q165A	1,1	1,1	0,9	1,0	1,1
Mutación en rata Q167A	0,8	1,0	0,8	0,7	0,9
Mutación en rata P28L	1,9	0,5	0,8	0,7	0,7
Mutación en rata R30K	2,9	0,5	0,5	1,1	0,7
Mutación en rata A40T	2,0	1,0	0,8	0,8	0,6
Mutación en rata V64K	35,7	1,3	0,7	S.U.	1,0
Mutación en rata S157R	1,6	0,9	0,9	0,8	1,0
K _D de ECD de PD-1 hu (nM)	2,68E- 11	3,38E- 09	5,67E-09	6,08E-09	1,24E- 09
	Cambio de K _D < 5 veces Mutantes para Alanina				
5-10	Cambio de K _D 5-10 veces Mutantes para Alanina				
10-50	Cambio de K _D 10 - 50 veces Mutantes para Alanina				

Mutación	12819. 17149	12865. 17150	nivolumab	pembrolizumab	13112. 15380
50-1000	Cambio de K_D 50 - 1000 veces				
	Mutantes para Alanina				
S.U.	Sin unión de mutantes para alanina				

* Se enumera la unión normalizada expresada como K_D de mutante/ K_D de tipo salvaje.

5 **Tabla 13** **Epítomos de unión a anticuerpos anti-PD-1 identificados mediante el uso de construcciones de fusión de Fc de PD-1 mutadas**

Anticuerpo	Bloqueo significativo de PD-L1/L2	Bin de Epítopo	Epítopo Lineal	Residuos de Contacto
12819.17149	Si	1C	56-64, 69-90, 122-140	V64, L128, P130, K131, A132
12865.17150	Si	1E	69-90, 122-140	K131, E136
nivolumab	Si	1D	127-135	
pembrolizumab	Yes	1F	56-64, 76-95, 120-125	V64, N66, D77, K78, P83, D85, S87, P89, G90, D92, L128
13112.15380	No	2		V44, T145

Ejemplo 12: Eficacia *in vivo* de un anticuerpo 12819 en cuatro modelos singénicos de tumores murinos

10 Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* de un anticuerpo 12819 en cuatro modelos

singénicos de tumores murinos.

Métodos

Se inocularon por vía subcutánea 2×10^5 células Sa1N (fibrosarcoma), 1×10^6 células CT26 (carcinoma de colon), 5×10^6 células ASB-XIV (carcinoma de pulmón), o 8×10^6 células MC38 (carcinoma de colon) en el flanco de ratones hembra de 6-8 semanas de edad A/J (Sa1N), BALB/cAnNRj (CT26 y ASB-XIV), o C57BL/6 (MC38). Los tumores se midieron tres veces por semana mediante un calibre en dos dimensiones y el volumen del tumor en mm^3 se calculó de acuerdo con la fórmula: $(\text{anchura})^2 \times \text{longitud} \times 0,5$. Con un tamaño promedio de tumor de $30\text{-}50 \text{ mm}^3$, los ratones se dividieron al azar en dos grupos de diez animales y se inició el tratamiento. Los ratones se trataron tres veces a la semana con un total de seis tratamientos mediante inyección intraperitoneal de tampón de vehículo o el anticuerpo monoclonal 12819.17149 seguido de un período de observación. Los tratamientos con anticuerpos se dosificaron a 10 mg/kg . Se aplicó ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para comparar volúmenes de tumores en cada punto temporal entre grupos de tratamiento. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

Los resultados muestran un efecto inhibitor tumoral profundo del anticuerpo 12819.17149 en todos los modelos tumorales singénicos sometidos a ensayo ($P < 0,001$ frente a vehículo) (Figura 10). El anticuerpo 12819.17149 indujo la regresión del crecimiento tumoral en el modelo de tumor Sa1N y dio como resultado un retraso del crecimiento tumoral en los modelos tumorales CT26, MC38 y ASB-XIV.

Ejemplo 13: Eficacia in vivo de un anticuerpo 12819 en un modelo de tumor de xenoinjerto semihumanizado con una mezcla de células T $\text{CD8}^+/\text{CD4}^+$ y células de melanoma A375

Este ejemplo demuestra la eficacia in vivo de un anticuerpo 12819 en un modelo de tumor de xenoinjerto semihumanizado, en el que la línea celular de melanoma humano A375 se mezcló con células T humanas CD8^+ y CD4^+ purificadas.

Métodos

Se aislaron $4,5 \times 10^5$ células T CD8^+ y CD4^+ de un donante de PBMC humano y se

mezclaron con $2,05 \times 10^6$ células de cáncer A375 (melanoma humano) antes de la inoculación subcutánea en el flanco de ratones NODscd1 hembra de 6-8 semanas de edad. El tratamiento se inició el día de la inoculación del tumor y los ratones se trataron tres veces a la semana para un total de seis tratamientos mediante inyección intraperitoneal de tampón de vehículo, Keytruda® (pembrolizumab) (10 mg/kg) o el anticuerpo monoclonal 12819.17149 (10 mg/kg) seguido de un periodo de observación. Los tumores se midieron tres veces a la semana mediante un calibre en dos dimensiones y se calculó el volumen del tumor en mm^3 de acuerdo con la fórmula: $(\text{ancho})^2 \times \text{longitud} \times 0,5$. Se aplicó ANOVA de dos vías con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para comparar los volúmenes tumorales en cada punto temporal entre los grupos de tratamiento. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

En el modelo de tumor semihumanizado, el tratamiento con el anticuerpo 12819.17149 dio como resultado un retraso significativo del crecimiento tumoral ($P < 0,001$ frente a vehículo), mientras que Keytruda® mostró un efecto limitado sobre el crecimiento tumoral en comparación con el grupo tratado con vehículo (Figura 11).

Tabla 14 Lista de SEQ ID NO

SEQ ID NO	Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de PD-1 humana
2	Secuencia de aminoácidos de V _H [12819.15384] humanizado
3	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12819.15384] humanizado
4	Secuencia de aminoácidos de V _H [12748.15381] humanizado
5	Secuencia de aminoácidos de V _L [12748.15381] humanizado
6	Secuencia de aminoácidos de V _H [12865.15377] humanizado
7	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12865.15377] humanizado
8	Secuencia de aminoácidos de V _H de [12892.15378] humanizado
9	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12892.15378] humanizado
10	Secuencia de aminoácidos de V _H de [12796.15376] humanizado
11	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12796.15376] humanizado
12	Secuencia de aminoácidos de V _H de [12777.15382] humanizado
13	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12777.15382] humanizado

14	Secuencia de aminoácidos de V _H de [12760.15375] humanizado
15	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12760.15375] humanizado
16	Secuencia de aminoácidos de de V _H de [13112.15380] humanizado
17	Secuencia de aminoácidos de V _L [13112.15380] humanizado
18-65	Secuencias CDR; véanse los SEQ ID NO en la Tabla 2 y las secuencias de la Tabla 5, así como la Lista de Secuencias de más abajo
66	Secuencia de aminoácidos de V _L de [12748.16124] humanizado (línea germinal alternativa)
67	Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG1 (variante LALA)
68	Secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera
69	Secuencia de ADN de V _H de [12819.15384] humanizado
70	Secuencia de ADN de V _L de [12819.15384] humanizado
71	Secuencia de ADN de V _H de [12748.15381] humanizado
72	Secuencia de ADN de V _L de [12748.15381] humanizado
73	Secuencia de ADN de V _H de [12865.15377] humanizado
74	Secuencia de ADN de V _L de [12865.15377] humanizado
75	Secuencia de ADN de V _H de [12892.15378] humanizado
76	Secuencia de ADN de V _L de [12892.15378] humanizado
77	Secuencia de ADN de V _H de [12796.15376] humanizado
78	Secuencia de ADN de V _L de [12796.15376] humanizado
79	Secuencia de ADN de V _H de [12777.15382] humanizado
80	Secuencia de ADN de V _L de [12777.15382] humanizado
81	Secuencia de ADN de V _H de [12760.15375] humanizado
82	Secuencia de ADN de V _L de [12760.15375] humanizado
83	Secuencia de ADN de V _H de [13112.15380] humanizado
84	Secuencia de ADN de V _L de [13112.15380] humanizado
85	Secuencia de ADN de V _L de [12748.16124] humanizado (línea germinal alternativa)
86	Secuencia de ADN genómico de la región constante de la cadena pesada con intrones incluidos
87	Secuencia de ADNc de la región constante de cadena pesada

88	Secuencia de ADNc de la región constante Lambda de cadena ligera
89	Polipéptido PD-1 de Macaca fascicularis, NCBI Acceso B0LAJ3_MACFA
90	Polipéptido PD-1 de Gallus gallus, Núm. de Acceso NCBI XP_422723.3
91	Polipéptido PD-1 de Mus musculus, Núm. de Acceso NCBI NP_032824.1
92	Polipéptido PD-1 de Rattus norvegicus, Núm. de Acceso NCBI XP_006245633.1