

Señores

**Superintendencia de Industria y Comercio**

Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D.

**Ref: Expediente No. NC2018/0005932.**

**Solicitud de registro de Patente de Invención denominada  
“MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS QUE TIENEN INMUNORREACTIVIDAD  
CON PD-1 Y CTLA-4, Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS”**

**Solicitud PCT No. PCT/US2016/066060.**

**Solicitante: MACROGENICS, INC.**

**Luz Helena Adarve**, identificada como aparece al pie de mi firma, y obrando en mi condición de apoderada de **MACROGENICS, INC.**, solicitante de la patente en referencia, presento la traducción al español de la solicitud en referencia.

El SIPI de la Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) presenta la tarea pendiente de *“Aporte de la traducción al Español”*.

Sobre lo anterior queremos indicar que no es claro por qué surge esta tarea debido a que con la presentación de la solicitud en referencia se incluyó debidamente la traducción al español de la solicitud. Le pedimos amablemente a la SIC si nos puede aclarar el origen de la tarea en referencia.

Sin embargo, y con el ánimo de darle diligencia a la solicitud, junto con este memorial se incluye la traducción de la solicitud prioritaria.

Atentamente,



**LUZ HELENA ADARVE GÓMEZ.**

C.C 41.575.435 de Bogotá.

T.P. 14.884 C.S.J.

---

FJG

P-982

**MOLÉCULAS BIESPECÍFICAS QUE TIENEN INMUNORREACTIVIDAD CON PD-1 Y CTLA-4, Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS**

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

5   **[0001]**     Esta solicitud es una continuación en parte de, y reclama prioridad para, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. de Serie. 62/266,944 (presentada: el 14 de diciembre de 2015; pendiente), cuya solicitud se incorpora en la presente en su totalidad.

10

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

15   **[0002]**     Esta solicitud incluye uno o más Listados de Secuencias en virtud de 37 C.F.R. 1.821 *et seq.*, los cuales se describen en un medio legible por computadora (nombre de archivo: 1301\_0134PCT\_ST25.txt, creado el 4 de diciembre de 2016, y que tiene un tamaño de 186,018 bytes), cuyo archivo se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

20   **[0003]**     La presente invención se dirige a moléculas biespecíficas (*por ejemplo*, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, moléculas de unión trivalente, *etc.*) que poseen al menos un sitio de unión al epítipo que es inmunoespecífico para un epítipo de PD-1 y al menos un sitio de unión al epítipo  
25   que es inmunoespecífico para un epítipo de CTLA-4 (*es decir*,

una "molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4"). La presente invención relaciona tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que poseen dos sitios de unión al epítipo que son inmunoespecíficos para uno o dos epítopos de PD-1 y dos sitios  
5 de unión al epítipo que son inmunoespecíficos para uno o dos epítopos de CTLA-4. La presente invención también se dirige a tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que comprenden adicionalmente una región Fc de inmunoglobulina. Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención son  
10 capaces de unirse de forma simultánea a PD-1 y a CTLA-4, en particular cuando tales moléculas se disponen en las superficies de las células humanas. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4, y con métodos que implican el  
15 uso de tales moléculas biespecíficas en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades y padecimientos. La presente invención también pertenece a métodos para utilizar tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 para estimular una respuesta inmune.

20

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

### **I. La Respuesta del Sistema Inmune al Cáncer**

**[0004]** El sistema inmune de los mamíferos está naturalmente listo para reconocer y eliminar células cancerosas (Topalian,  
25 S.L. et al. (2015) "*Immune Checkpoint Blockade: A Common*

*Denominator Approach to Cancer Therapy*", Cancer Cell 27:450-461). En individuos saludables, el sistema inmune se encuentra en un estado quiescente, inhibido por un repertorio de diversos receptores y ligandos de inhibición. Tales rutas de "punto de control" inmune son importantes al mantener la autotolerancia (es decir, en evitar cuando un sujeto monta un ataque del Sistema inmune contra sus propias células (una reacción "autoinmune") y en limitar el daño antimicrobiano del tejido colateral o respuestas inmunes antialérgicas. Después del reconocimiento de un antígeno de cáncer, la detección de un patógeno microbiano, o la presencia de un alérgeno, una disposición de receptores y ligandos de activación induce la activación del sistema inmune. Tal activación lleva a la activación de macrófagos, células Exterminadoras Naturales (NK) y células T citotóxicas específicas al antígeno y promueve la liberación de diversas citocinas, todas de las cuales actúan para contrarrestar la amenaza percibida en la salud del sujeto (Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation", Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cáncer Immunotherapy", Adv. Immunol. 90:297-339). El sistema inmune es capaz de regresar a su estado quiescente normal cuando las señales inmunes de inhibición de la compensación pesan más que las señales inmunes de

activación.

**[0005]** De este modo, el estado de la enfermedad de cáncer (y de hecho, los estados de enfermedad de las enfermedades infecciosas) pueden considerarse que reflejan una falla en el sistema inmune del sujeto activo de forma adecuada. Tal falla puede reflejar una presentación inadecuada de las señales inmunes de activación, o puede reflejar una capacidad inadecuada para mejorar las señales inmunes de inhibición en el sujeto. En algunos casos, la invención ha determinado que las células de cáncer pueden cooptar el sistema inmune para evadir ser detectadas por el sistema inmune (Topalian, S.L. et al. (2015) "*Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy*", Cancer Cell 27:450-461).

**[0006]** De importancia particular es la unión entre los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de la Célula que Presenta el Antígeno y los receptores CD28 y CTLA-4 de los linfocitos T de CD4<sup>+</sup> (Sharpe, A.H. et al. (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. et al. (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*", Immunol. Rev. 229:307-321). Una unión de B7.1 o de B7.2 a CD28 estimula la activación de células T; la unión de B7.1 o B7.2 a CTLA-4 inhibe tal activación (Dong, C. et al. (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*", Immunolog. Res.

28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*", Immunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "*The B7 Family Revisited*", Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). CD28 se expresa de forma constitutiva en la superficie de células T (Gross, J., et al. (1992) "*Identification And Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse*", J. Immunol. 149:380-388), mientras que la expresión de CTLA-4 se sobrerregula rápidamente después de la activación de las células T (Linsley, P. et al. (1996) "*Intracellular Trafficking Of CTLA4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement*", Immunity 4:535-543). Puesto que CTLA-4 es el receptor de mayor afinidad (Sharpe, A.H. et al. (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Topalian, S.L. et al. (2015) "*Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cáncer Therapy*", Cancer Cell 27:450-461), la unión inicia primero la proliferación de células T (mediante CD28) después la inhibe (mediante la expresión naciente de CTLA-4), amortiguando de este modo el efecto cuando la proliferación ya no es necesaria.

20

## II. CTLA-4

[0007] Los linfocitos T citotóxicos asociados con la proteína 4 (CTLA-4; CD152) son una proteína de membrana tipo I de un solo paso que forma un homodímero enlazado a disulfuro (Schwartz J.C., et al. (2001) "*Structural Basis For Co-*

25

*Stimulation By The Human CTLA-4/B7-2 Complex"*, Nature 410:604-608). La variantes de empalme alternativo, que codifican isoformas diferentes, se han caracterizado incluyendo una isoforma soluble que funciona como un monómero (Magistrelli G., et al. (1999) "A Soluble Form Of CTLA-4 Generated By Alternative Splicing Is Expressed By Nonstimulated Human T Cells", Eur. J. Immunol. 29:3596-3602; Oaks M.K. et al. (2000) "A Native Soluble Form Of CTLA-4", Cell Immunol 201:144-153).

**[0008]** CTLA-4 principalmente es un antígeno intracelular cuya expresión de superficie se encuentra regulada estrictamente por el tráfico restringido en la superficie celular e internalización rápida (Alegre M-L, et al., (1996) "Regulation Of Surface And Intracellular Expression Of CTLA4 On Mouse T Cells", J. Immunol. 157:4762-4770; Linsley, P.S. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement", Immunity 4:535-543). CTLA-4 se expresa a menores niveles en la superficie de las células T efectoras inactivadas (Alegre, M.L., et al. (1996) "Regulation Of Surface And Intracellular Expression Of CTLA 4 On Mouse T Cells", J Immunol 157:4762-70), y de manera constitutiva expresado en las células T reguladoras (Wang, X.B., et al. (2002) "Expression Of CTLA-4 By Human Monocytes", Scand. J. Immunol. 55:53-60).

**[0009]** La región extracelular de CTLA-4 comprende un solo dominio de Ig(V) extracelular, seguido por una región de

transmembrana (TM) y una cola citoplásmica intracelular pequeña (37 aminoácidos). La cola intracelular contiene dos motivos a base de tirosina, que interactúan con diversas proteínas intracelulares, incluyendo la lípido cinasa fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), las fosfatasas SHP-2 y PP2A y las proteínas adaptadoras de claritina AP-1 y AP-2 (Rudd, C.E. et al. (2003) "Unifying Concepts In CD28, ICOS And CTLA4 Co-Receptor Signalling", Nat Rev Immunol. 3:544-56). CTLA-4 se relaciona con CD28, con las dos proteínas que tienen aproximadamente 29% de identidad a nivel de aminoácidos (Harper, K. (1991) "CTLA-4 And CD28 Activated Lymphocyte Molecules Are Closely Related In Mouse And Human As To Sequence, Message Expression, Gene Structure, And Chromosomal Location", J. Immunol. 147:1037-1044).

15 **[0010]** Cuando se activa una célula efectora T inactivada a través de sus receptores de células T (TCR), CTLA-4 se recluta en la superficie celular (Linsley, P.S., et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement", Immunity 4:535-43). Una vez  
20 que CTLA-4 se expresa en la superficie de células T, compete con CD28 (expresado de forma constitutiva en las células T) por CD80/CD86, apagando de este modo la señalización adicional a través de TCR y de este modo desregula cualquier respuesta de las células T adicionales por señalización de TCR (Carreno,  
25 B.M., et al. (2000) "CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell

*Activation By Two Different Mechanisms Depending On Its Level Of Cell Surface Expression*", J Immunol 165:1352-6; Chuang, E., et al. (1999) "Regulation Of Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Molecule-4 By Src Kinases", J Immunol 162:1270-7). De este modo, CTLA-4 actúa como un regulador negativo de la activación de células efectoras T que disminuye la función efectora e indica la eficacia y duración de una respuesta de células T (Linsley, P.S., et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA-4 And Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement", Immunity 4:535-43).

**[0011]** Además, CTLA-4 puede jugar un papel en intensificar el efecto negativo de las células T reguladoras en la respuesta inmune al cáncer (Tai, Y.T., et al., (2012) "Potent in vitro And in vivo Activity Of An Fc-Engineered Humanized Anti-HM1.24 Antibody Against Multiple Myeloma via Augmented Effector Function", Blood 119:2074-82). CTLA-4 tiene una afinidad mucho mayor para los miembros de la familia B7 que para CD28, y por lo tanto, su expresión en una célula T indica una regulación negativa dominante de las células T (Allison, J.P., et al. (1995) "Manipulation Of Costimulatory Signals To Enhance Antitumor T-Cell Responses", Curr Opin Immunol 7:682-6). El mecanismo por el cual CTLA-4 contribuye con la función supresora de las células T reguladoras se entiende de forma incompleta, pero la expresión de CTLA-4 en las células T reguladoras intensifica la función supresora de estas células

(Tai, Y.T., et al., (2012) "*Potent in vitro And in vivo Activity Of An Fc-Engineered Humanized Anti-HM1.24 Antibody Against Multiple Myeloma via Augmented Effector Function*", Blood 119:2074-82).

5   **[0012]**     El bloqueo de CTLA-4 se reporta por intensificar las respuestas de las células T *in vitro* (Walunas, T.L., et al. (1994) "*CTLA-4 Can Function As A regulador negativo Of T Cell Activation*", Immunity 1:405-413) e *in vivo* (Kearney, E.R., et al. (1995) "*Antigen-Dependent Clonal Expansion Of A Trace*  
10   *Population Of Antigen-Specific CD4+ T Cells in vivo Is Dependent On CD28 Costimulation And Inhibited By CTLA-4*", J. Immunol. 155:1032-1036) y también incrementar la inmunidad antitumor (Leach, D.R. et al. (1996) "*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*", Science 271:1734-1736). De este  
15   modo, se ha propuesto el bloqueo de CTLA-4 que utiliza anticuerpos anti-CTLA-4 para proporcionar nuevos tratamientos de enfermedad, especialmente enfermedades humanas donde la estimulación inmune puede ser benéfica tal como para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas (véase,  
20   Leach, D.R., et al. (1996) "*Enhancement Of Antitumor Immunity By CTLA-4 Blockade*", Science. 271:1734-1736; y Publicaciones PCT Nos. WO 01/14424; WO 00/37504). La función del desarrollo de los bloqueadores de CTLA-4 se ha enfocado en el uso de anticuerpos monoclonales tales como ipilimumab (véase, por  
25   ejemplo, Hodi, F.S., et al., (2003) "*Biologic Activity Of*

*Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Antibody Blockade In Previously Vaccinated Metastatic Melanoma And Ovarian Carcinoma Patients*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 100:4717-4717) y tremelimumab (Ribas, A. et al. (2005) "Antitumor Activity In Melanoma And Anti-Self Responses In A Phase I Trial With The Anti-Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4 Monoclonal Antibody CP-675,206", Oncologist 12: 873-883).

Programmed Death-1 ("PD-1")

**[0013]** La Muerte programada 1 ("PD-1", también conocida como "CD279") es un miembro de proteínas de membrana de tipo I de la familia de CD28/CTLA-4 extendida de reguladores de células T que regulan de forma negativa y amplia las respuestas inmunes (Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death", EMBO J. 11:3887-3895; Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 2007/0202100; 2008/0311117; 2009/00110667; Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,808,710; 7,101,550; 7,488,802; 7,635,757; 7,722,868; Publicación PCT No. WO 01/14557).

**[0014]** Las interacciones de receptor-ligando del Sistema PD-1 parecen ser incluso más complejas que aquellas del Sistema CD28/CTLA-4. PD-1 se expresa en la superficie celular de las células T activadas, células B, y monocitos (Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes", Int. Immunol. 8(5):765-

772; Yamazaki, T. et al. (2002) "*Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC*", J. Immunol. 169:5538-5545) y en bajos niveles en células T exterminadoras naturales (NK) (Nishimura, H. et al. (2000) "*Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice*", J. Exp. Med. 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*", Semin. Cáncer Biol. 17(4):288-298).

**[0015]** La región extracelular de PD-1 consiste de un solo dominio de inmunoglobulina (Ig)V cpm 23% de identidad en el dominio equivalente en CTLA-4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*", Semin. Cáncer Biol. 17(4):288-298). El dominio de IgV extracelular se sigue por una región de transmembrana y una cola intracelular. La cola intracelular contiene dos sitios de fosforilación ubicados en un motivo inmunorreceptor inhibidor a base de tirosina y un motivo estratificado inhibidor a base de tirosina, el cual sugiere que PD-1 regula de forma negativa las señales de TCR (Ishida, Y. et al. (1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*", EMBO J. 11:3887-3895; Blank, C. et al. (2006) "*Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer*", Immunol. Immunother. 56(5):739-745).

**[0016]** PD-1 media su inhibición del sistema inmune al unirse a B7-H1 y B7-DC (también conocido como PD-L1 y PD-L2, Flies, D.B. et al. (2007) "*The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity*", J. Immunother. 30(3):251-260; Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,803,192; 7,794,710; Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; Publicación PCT Nos. WO 01/39722; WO 02/086083).

**[0017]** B7-H1 y B7-DC se expresan ampliamente en las superficies de muchos tipos de tejidos de humano y de murino, tales como corazón, placenta, músculo, hígado fetal, bazo, nódulos linfáticos, y timo, así como hígado de murino, pulmón, riñón, células de los islotes del páncreas e intestino delgado (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*", Semin. Cáncer Biol. 17(4):288-298). En los humanos, se ha encontrado la expresión de la proteína B7-H1 en células endoteliales de humano (Chen, Y. et al. (2005) "*Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells*", Nephron. Exp. Nephrol. 102:e81-e92; de Haij, S. et al. (2005) "*Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1*" Kidney Int. 68:2091-2102; Mazanet, M.M. et al. (2002) "*B7-H1 Se expresa By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis*", J. Immunol. 169:3581-3588), myocardium (Brown, J.A. et al. (2003) "*Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic*

*Cells Enhances activación de células T And Cytokine Production*", J. Immunol. 170:1257-1266), syncytiotrophoblasts (Petroff, M.G. et al. (2002) "*B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface*", Placenta 23:S95-S101). Las moléculas también se expresan por macrófagos residentes de ciertos tejidos, por macrófagos que se han activado con el interferón (IFN)- $\gamma$  o el factor de necrosis de tumor (TNF)- $\alpha$  (Latchman, Y. et al. (2001) "*PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell activation*", Nat. Immunol 2:261-268), y en tumores (Dong, H. (2003) "*B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity*", J. Mol. Med. 81:281-287).

**[0018]** Se ha encontrado que la interacción entre B7-H1 y PD-1 proporciona una señal co-estimuladora negativa crucial en células T y B (Martin-Orozco, N. et al. (2007) "*Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity*", Semin. Cáncer Biol. 17(4):288-298) y funciona como un inductor de la muerte celular (Ishida, Y. et al. (1992) "*Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death*", EMBO J. 11:3887-3895; Subudhi, S.K. et al. (2005) "*The Balance Of Respuesta inmunes: Costimulation Verse Coinhibition*", J. Molec. Med. 83:193-202). Más específicamente, se ha encontrado que la interacción entre las bajas concentraciones del receptor de PD-1 y el ligando B7-H1 resulta en la transmisión de una señal inhibidora que inhibe

fuertemente la proliferación de las células T de CD8<sup>+</sup> específica del antígeno; en altas concentraciones, las interacciones con PD-1 no inhiben la proliferación de las células T pero reducen de forma marcada la producción de múltiples citocinas (Sharpe, A.H. et al. (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126). Se ha encontrado que la proliferación de células T y producción de citocinas por ambas células T de CD4 y CD8 en reposo y previamente activadas, e incluso por las células T nativas de sangre de cordón umbilical, se inhiben por proteínas de fusión de B7-H1-Fc solubles (Freeman, G.J. et al. (2000) "*Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation*", J. Exp. Med. 192:1-9; Latchman, Y. et al. (2001) "*PD-L2 Is A Second Ligand Para PD-1 And Inhibits T cells activation*", Nature Immunol. 2:261-268; Carter, L. et al. (2002) "*PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2*", Eur. J. Immunol. 32(3):634-643; Sharpe, A.H. et al. (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126).

**[0019]** El papel de B7-H1 y PD-1 al inhibir la activación y proliferación de las células T ha sugerido que estas biomoléculas pueden servir como objetivos terapéuticos para los tratamientos de inflamación y cáncer. De este modo, se ha propuesto el uso de anticuerpos anti-PD-1 para tratar

infecciones y tumores y para sobremodular una respuesta inmune adaptativa (véase, Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 2010/0040614; 2010/0028330; 2004/0241745; 2008/0311117; 2009/0217401; Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,521,051; 7,563,869; 7,595,048; Publicaciones PCT Nos. WO 2004/056875; WO 2008/083174). Los anticuerpos capaces de unirse específicamente a PD-1 se han reportado por Agata, T. et al. (1996) "*Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes*", Int. Immunol. 8(5):765-772; and Berger, R. et al. (2008) "*Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies*", Clin. Cancer Res. 14(10):3044-3051 (véase también, Patentes de los Estados Unidos No. 8,008,449 y 8,552,154 Publicaciones de Patente de los Estados Unidos Nos. 2007/0166281; 2012/0114648; 2012/0114649; 2013/0017199; 2013/0230514 y 2014/0044738; y Publicaciones de Patente de PCT Nos. WO 2003/099196; WO 2004/004771; WO 2004/056875; WO 2004/072286; WO 2006/121168; WO 2007/005874; WO 2008/083174; WO 2009/014708; WO 2009/073533; WO 2012/135408, WO 2012/145549; y WO 2013/014668).

**[0020]** Sin embargo, a pesar de todos los avances anteriores, permanece una necesidad para composiciones mejoradas capaces de dirigir de forma más vigorosa el Sistema inmune del cuerpo para atacar células de cáncer o células infectadas por

patógenos, especialmente a bajas concentraciones terapéuticas y/o con efectos secundarios reducidos. Aunque el sistema inmune adaptativo puede ser un mecanismo de defensa potente contra el cáncer y la enfermedad, a menudo se obstaculiza por los  
5 mecanismos de supresión/evasión inmune en el microambiente de tumor, tal como la expresión de PD-1 y CTLA-4. Además, las moléculas co-inhibidoras expresadas por las células de tumor, células inmunes, y células estromales en el medio tumoral pueden atenuar de forma dominante las respuestas de las células  
10 T contra células de cáncer. Además, el uso de anticuerpos anti-CTLA-4 induce efectos secundarios bien identificados denominados como "eventos adversos inmunorrelacionados" (irAE). Los IrAE incluyen colitis/diarrea, dermatitis, hepatitis, endocrinopatías, y miopatía inflamatoria. Estos  
15 efectos secundarios únicos se reportaron para surgir debido al rompimiento de la tolerancia inmune sobre el bloqueo de CTLA-4 (Di Giacomo, A.M., et al. (2010) "*The Emerging Toxicity Profiles Of Anti-CTLA-4 Antibodies Across Clinical Indications*", Semin Oncol. 37:499-507). En consecuencia, las  
20 terapias que superan estas limitaciones pueden ser de gran beneficio.

**[0021]** Como se describe en detalle a continuación, la presente invención aborda esta necesidad al proporcionar moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4. Tales moléculas  
25 biespecíficas son capaces de unirse a las moléculas PD-1 y

CTLA-4 que se encuentran presentes en las superficies de los linfocitos que infiltran el tumor agotado y tolerante y otros tipos celulares, y por lo tanto perjudicar la capacidad de tales moléculas de superficie celular para responder a sus respectivos ligandos. Como tales, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención actúan para bloquear la inhibición del sistema inmune mediado por PD-1 y CTLA-4, a modo de promover la activación o continuar con la activación del sistema inmune. Estos atributos permiten que tales moléculas biespecíficas tengan utilidad para estimular el sistema inmune y en particular en el tratamiento de cáncer y enfermedades y padecimientos asociados con el patógeno. La presente invención se dirige a estas y otras metas.

#### COMPENDIO DE LA INVENCION

**[0022]** La presente invención se dirige a moléculas biespecíficas (por ejemplo, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, moléculas de unión trivalente, etc.) que poseen al menos un sitio de unión al epítipo que es inmuno-específico para un epítipo de PD-1 y al menos un sitio de unión al epítipo que es inmuno-específico para un epítipo de CTLA-4 (es decir, una "molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4"). La presente invención se refiere a tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que poseen dos sitios de unión al epítipo que son inmuno-específicos para uno o dos epítopos de PD-1 y dos sitios de unión al epítipo que son inmuno-específicos para uno o dos

epítomos de CTLA-4. La presente invención también se dirige a tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que comprenden adicionalmente una región Fc de inmunoglobulina. Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención son  
5 capaces de unirse de forma simultánea a PD-1 y a CTLA-4, en particular cuando tales moléculas se disponen en las superficies de las células humanas. La invención se dirige a composiciones farmacéuticas que contienen tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4, y a métodos que implican el  
10 uso de tales moléculas biespecíficas en el tratamiento de cáncer y otras enfermedades y padecimientos. La presente invención también pertenece a métodos para utilizar tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 para estimular una respuesta inmune.

15 **[0023]** En detalle, la invención proporciona una molécula biespecífica que posee tanto uno o más sitios de unión al epítomo capaces de unión inmuno-específica a (un) epítomo(s) de PD-1 y uno o más sitios de unión al epítomo capaces de unión inmuno-específica a (un) epítomo(s) de CTLA-4, en donde la  
20 molécula comprende:

(A) un Dominio Variable de Cadena Pesada y un Dominio Variable de Cadena Ligera de un anticuerpo que une PD-1;  
y

(B) un Dominio Variable de Cadena Pesada y un Dominio  
25 Variable de Cadena Ligera de un anticuerpo que une CTLA-

4;

en donde la molécula de unión biespecífica es:

(i) un diacuerpo, el diacuerpo siendo un complejo enlazado de forma covalente que comprende dos, tres, cuatro o cinco cadenas de polipéptidos; o

(ii) una molécula de unión trivalente, la molécula de unión trivalente siendo un complejo enlazado de forma covalente que comprende tres, cuatro, cinco o más cadenas de polipéptidos.

10 **[0024]** La invención se relaciona con la modalidad de tales moléculas biespecíficas, en donde la molécula de unión biespecífica muestra una actividad que se intensifica en relación con tal actividad mostrada por dos moléculas monoespecíficas, una de las cuales posee el Dominio Variable de Cadena Pesada y el Dominio Variable de Cadena Ligera del anticuerpo que une PD-1 y la otra de las cuales posee el Dominio Variable de Cadena Pesada y el Dominio Variable de Cadena Ligera del anticuerpo que une CTLA-4.

20 **[0025]** La invención se refiere a la modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas, en donde la molécula obtiene pocos eventos adversos inmunes relacionados (irAE) cuando se administra a un sujeto en necesidad del mismo en relación con tales iRE obtenidos por la administración de un anticuerpo monoespecífico que une CTLA-4, tal como ipilimumab.

25 **[0026]** Adicionalmente, la invención se refiere a la

modalidad de tales moléculas biespecíficas en las cuales la molécula comprende una Región de Fc. Adicionalmente la invención se refiere a la modalidad de tales moléculas biespecíficas en donde la Región de Fc es una Región de Fc variante que comprende:

- (A) una o más modificaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la Región de Fc variante para una FcγR; y/o
- (B) una o más modificaciones de aminoácidos que intensifican la vida media en suero de la Región Fc variante.

10 **[0027]** Adicionalmente, la invención se refiere a la modalidad de tales moléculas biespecíficas en donde las modificaciones que reducen la afinidad de la Región de Fc variante para una FcγR comprenden la sustitución de L234A; L235A; o L234A y L235A, en donde la numeración es aquella del  
15 índice EU como en Kabat.

**[0028]** Adicionalmente, la invención se refiere a la modalidad de tales moléculas biespecíficas en donde las modificaciones que intensifican la vida media en suero de la Región de Fc variante comprenden la sustitución de M252Y; M252Y  
20 y S254T; M252Y y T256E; M252Y, S254T y T256E; o K288D y H435K, en donde la numeración es aquella del índice EU como en Kabat.

**[0029]** Adicionalmente, la invención se refiere a la modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde la molécula es el diacuerpo y comprende dos sitios de unión al  
25 epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de PD-

1 y dos sitios de unión al epítipo capaces de unión  
inmunoespecífica a un epítipo de CTLA-4.

**[0030]** Adicionalmente, la invención se refiere a la  
modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde  
5 la molécula es la molécula de unión trivalente y comprende dos  
sitios de unión al epítipo capaces de unión inmunoespecífica a  
un epítipo de PD-1 y un sitio de unión al epítipo capaces de  
unión inmunoespecífica a un epítipo de CTLA-4.

**[0031]** Adicionalmente, la invención se refiere a la  
10 modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde  
la molécula es capaz de unirse a las moléculas de PD-1 y CTLA-  
4 presentes en la superficie celular.

**[0032]** Adicionalmente, la invención se refiere a la  
modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde  
15 la molécula es capaz de unirse de forma simultánea a PD-1 y  
CTLA-4.

**[0033]** Adicionalmente, la invención se refiere a la  
modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde  
la molécula promueve la estimulación de células inmunes, y en  
20 particular en donde la estimulación de células inmunes resulta  
en:

(A) proliferación de células inmunes; y/o

(B) producción y/o liberación de células inmunes de al  
menos una citocina; y/o

25 (C) producción y/o liberación de células inmunes de al

menos una molécula lítica; y/o

(D) expresión de células inmunes de al menos un marcador de activación.

**[0034]** Adicionalmente, la invención se refiere a la  
5 modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde la célula inmune es un linfocito T o una célula NK.

**[0035]** Adicionalmente, la invención se refiere a la  
modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde  
los sitios de unión al epítipo capaces de unión  
10 inmuno-específica a un epítipo de PD-1 comprenden:

- (A) el Dominio de VH de mAb 1 de PD-1 (**SEQ ID NO:47**) y el Dominio de VL de mAb 1 de PD-1 (**SEQ ID NO:48**); o
- (B) el Dominio de VH de mAb 2 de PD-1 (**SEQ ID NO:49**) y el Dominio de VL de mAb 2 de PD-1 (**SEQ ID NO:50**); o
- 15 (C) el Dominio de VH de mAb 3 de PD-1 (**SEQ ID NO:51**) y el Dominio de VL de mAb 3 de PD-1 (**SEQ ID NO:52**); o
- (D) el Dominio de VH de mAb 4 de PD-1 (**SEQ ID NO:53**) y el Dominio de VL de mAb 4 de PD-1 (**SEQ ID NO:54**); o
- (E) el Dominio de VH de mAb 5 de PD-1 (**SEQ ID NO:55**) y  
20 el Dominio de VL de mAb 5 de PD-1 (**SEQ ID NO:56**); o
- (F) el Dominio de VH de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:57**) y el Dominio de VL de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:58**); o
- (G) el Dominio de VH de mAb 6-I de PD-1 de VH (**SEQ ID NO:86**) y el Dominio de VL de mAb 6-SQ de PD-1 de VL  
25 (**SEQ ID NO:87**); o

- (H) el Dominio de VH de mAb 7 de PD-1 (**SEQ ID NO:59**) y el Dominio de VL de mAb 7 de PD-1 (**SEQ ID NO:60**); o
- (I) el Dominio de VH de mAb 8 de PD-1 (**SEQ ID NO:61**) y el Dominio de VL de mAb 8 de PD-1 (**SEQ ID NO:62**).

5   **[0036]**   Adicionalmente, la invención se refiere a la modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde los sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de CTLA-4 comprenden:

- 10           (A) el Dominio de VH de mAb 1 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:76**) y el Dominio de VL de mAb 1 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:77**);  
              o
- (B) el Dominio de VH de mAb 2 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:78**) y el Dominio de VL de mAb 2 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:79**);  
              o
- 15           (C) el Dominio de VH de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:90**) y el Dominio de VL de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:91**).

**[0037]**   Adicionalmente, la invención se refiere a la modalidad de tales moléculas biespecíficas en donde:

- 20           (A) los sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de PD-1 comprenden el Dominio de VH de mAb 6-I de PD-1 de VH (**SEQ ID NO:86**) y el Dominio de VL de mAb 6-SQ de PD-1 (**SEQ ID NO:87**);  
              y
- 25           (B) los sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de CTLA-4 comprenden

el Dominio de VH de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:90**) y  
el Dominio de VL de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:91**).

**[0038]** Adicionalmente, la invención se refiere a la  
modalidad de todas de tales moléculas biespecíficas en donde

5 la molécula comprende:

- (A) dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:95**,  
y dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID  
NO:96**; o
- 10 (B) dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:97**,  
y dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID  
NO:98**; o
- (C) dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:99**,  
y dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID  
NO:100**; o
- 15 (D) dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:102**,  
y dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID  
NO:103**; o
- (E) dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:101**,  
y dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID  
20 NO:100**; o
- (F) una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:104**,  
una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:105**,  
una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:106**,  
y una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:107**;  
25 o

(G) una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:108**,  
una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:105**,  
una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:109**,  
y una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:107**.

5   **[0039]**   Adicionalmente, la invención se refiere a la  
modalidad de tales moléculas biespecíficas en las cuales la  
molécula comprende un Dominio de Unión a la Albúmina, y  
especialmente un Dominio desinmunizado de Unión a la Albúmina.

10   **[0040]**   Adicionalmente, la invención se refiere a una  
composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva  
de cualquiera de tales moléculas biespecíficas y un portador  
farmacéuticamente aceptable.

15   **[0041]**   Adicionalmente, la invención se refiere al uso de  
tal composición farmacéutica o al uso de cualquiera de las  
moléculas biespecíficas descritas en lo anterior para promover  
la estimulación de una respuesta inmune mediada de un sujeto  
en necesidad de la misma, y en particular, en donde tal molécula  
promueve la estimulación de células inmunes, y en particular,  
la estimulación de células NK y/o linfocitos T. La invención  
20   se refiere en particular a las modalidades en donde tal  
estimulación resulta en la proliferación de células inmunes,  
producción y/o liberación de células inmunes de citocinas (*por  
ejemplo*, IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ , *etc.*), producción y/o liberación de  
células inmunes de moléculas líticas (*por ejemplo*, granzima,  
25   perforina, *etc.*), y/o expresión de células inmunes de

marcadores de activación (*por ejemplo*, CD69, CD25, CD107a, etc.). La invención además se refiere a métodos para tratar cáncer u otras enfermedades que implican el uso o administración de cualquiera de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 descritas en lo anterior para estimular una respuesta inmune mediada. La invención se refiere en particular a las modalidades en las cuales la actividad inmune estimuladora de cualquiera de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 descritas en lo anterior es más potente que la unión o administración combinada de un anticuerpo anti-PD-1 separado y un anticuerpo anti-CTLA-4 separado (especialmente, en donde tales anticuerpos son monoespecíficos para tales moléculas). La invención también se refiere a modalidades en las cuales las células inmunes, en particular células NK y/o linfocitos T, estimuladas por las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 descritas en lo anterior muestran una proliferación intensificada, producción y/o liberación alterada de citocinas (*por ejemplo*, IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ , etc.), producción y/o liberación alterada de moléculas líticas, y/o expresión alterada de marcadores de activación en relación con aquellos mostrados por tales células estimuladas por la unión o administración combinada de un anticuerpo anti-PD-1 separado y un anticuerpo anti-CTLA-4 separado. La invención también se refiere a modalidades en las cuales las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 descritas en lo anterior tienen una incidencia

reducida de irAE. Adicionalmente, la invención se relaciona con modalidades en las cuales cualquiera de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 descritas en lo anterior se utilizan en el tratamiento de una enfermedad o padecimiento  
5 asociado con un sistema inmune suprimido, especialmente cáncer o una infección.

**[0042]** Adicionalmente, la invención se refiere a tal uso para tratar una enfermedad o padecimiento asociado con un sistema inmune suprimido, o en el tratamiento de tal enfermedad  
10 o padecimiento. La invención se refiere en particular a tal uso en el tratamiento de una enfermedad o padecimiento asociado con un sistema inmune suprimido, o en donde la enfermedad o padecimiento es cáncer o una infección (en particular, una infección caracterizada por la presencia de un patógeno  
15 bacteriano, fúngico, viral o protozoario).

**[0043]** La invención se refiere en particular a tal uso en donde:

(A) el uso se encuentra en el tratamiento de cáncer, y el cáncer se caracteriza por la presencia de una célula de  
20 cáncer seleccionada del grupo que consiste de una célula de: un tumor de glándulas adrenales, un cáncer asociado con SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandas, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor metastásico de  
25 cerebro, un cáncer de mama, un tumor en el cuerpo de la

carótida, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un  
 cordoma, un carcinoma cromóforo de células renales, un  
 carcinoma de células transparentes, un cáncer de colon,  
 un cáncer colorrectal, un histiocitoma cutáneo fibroso  
 5 benigno, un tumor desmoplásico de células redondas  
 pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un  
 condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ostium de  
 fibrogénesis imperfecta, una displasia fibrosa del hueso,  
 un cáncer de vesícula biliar o conducto biliar, cáncer  
 10 gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un  
 tumor de células germinales, un cáncer de cabeza y cuello,  
 carcinoma hepatocelular, un tumor en las células de  
 islote, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una  
 leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un  
 15 liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer de  
 hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un  
 meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia  
 endócrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome  
 mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores  
 20 neuroendócrinos, un cáncer de ovario, un cáncer  
 pancreático, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor  
 en paratiroides, un cáncer pediátrico, un tumor periférico  
 en las vainas nerviosas, un feocromocitoma, un tumor de  
 pituitaria, un cáncer de próstata, un melanoma uveal  
 25 posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer

metastásico renal, un tumor rabdoide, un rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides, y un cáncer uterino; o

(B) el uso se encuentra en el tratamiento de la infección, y la infección es una infección crónica viral, bacteriana, por hongos y parasítica, caracterizada por la presencia del virus de Epstein Barr, Virus de la Hepatitis A (VHA); Virus de la Hepatitis B (VHB); Virus de la Hepatitis C (VHC); virus de herpes (*por ejemplo* HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de Estomatitis Vesicular (VSV), *Bacilli, Citrobacter, Cholera, Diphtheria, Enterobacter, Gonococci, Helicobacter pylori, Klebsiella, Legionella, Meningococci, mycobacteria, Pseudomonas, Pneumonococci, bacterias de ricketsia, Salmonella, Serratia, Staphylococci, Streptococci, Tetanus, Aspergillus (A. fumigatus, A. niger, etc.), Blastomyces dermatitidis, Candida (C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C. tropicalis, etc.), Cryptococcus neoformans, Género Mucorales (mucor, absidia, rhizopus), Sporothrix schenkii, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Leptospirosis, Borrelia*

*burgdorferi*, helmintos parásitos (anquilostoma, solitarias, tremátodos, lombrices planas (por ejemplo *Schistosomia*), *Giardia lamblia*, *trichinella*, *Dientamoeba Fragilis*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, o

5 *Leishmania donovani*.

[0044] La invención se refiere en particular a tal uso en el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga,

10 neuroblastoma; sarcoma, linfoma de no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, u cáncer rectal, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica B aguda (B-ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células

15 pilosas (HCL), neoplasma de células blásticas dendríticas plasmacitoides (BPDCN), linfoma de no Hodgkins (NHL), incluyendo leucemia de células del manto (MCL), y linfoma de células linfocíticas pequeñas (SLL), linfoma de Hodgkin, mastocitosis sistémica, o linfoma de Burkitt.

20

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0045] La **Figura 1** proporciona un diagrama esquemático de un diacuerpo representativo enlazado de forma covalente que tiene dos sitios de unión al epítipo compuestos de dos cadenas

25 de polipéptidos, cada una tiene un Dominio Promotor de

Heterodímeros de hélice E o hélice K (los Dominios Promotores de Heterodímeros se proporcionan a continuación). Puede estar presente un residuo de cisteína en un enlazador y/o en el Dominio Promotor de Heterodímeros como se muestra en la **Figura**

5 **3B**. Los Dominios de VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran utilizando el mismo patrón sombreado o de relleno.

[0046] La **Figura 2** proporciona un diagrama esquemático de una molécula de diacuerpo representativa enlazada de forma covalente que tiene dos sitios de unión al epítipo compuestos de dos cadenas de polipéptidos, cada una tiene un Dominio CH2 y CH3, de modo que las cadenas asociadas forman toda o parte de una Región de Fc. Los Dominios de VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran utilizando el mismo patrón sombreado o de relleno.

15 [0047] Las **Figuras 3A-3C** proporcionan diagramas esquemáticos que muestran diacuerpos tetravalentes representativos unidos de forma covalente que tienen cuatro sitios de unión al epítipo compuestos de dos pares de cadenas de polipéptidos (*es decir*, cuatro cadenas de polipéptidos en total). Un polipéptido de cada par posee un Dominio de CH2 y CH3, de modo que las cadenas asociadas forman toda o parte de una Región de Fc. Los Dominios de VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran utilizando el mismo patrón sombreado o de relleno. Los dos pares de cadenas de polipéptidos pueden ser iguales. En tales modalidades en donde los dos pares de

20

25

cadenas de polipéptidos son iguales y los Dominios de VL y VH reconocen epítomos diferentes (como se muestra en las **Figuras 3A-3B**), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión al epítomo y es específica y bivalente con respecto a cada epítomo  
5   enlazado. En tales modalidades en donde los Dominios de VL y VH reconocen el mismo epítomo (*por ejemplo*, las mismas CDR del Dominio de VL y las mismas CDR del Dominio de VH se utilizan en ambas cadenas), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión al epítomo y es monoespecífica y tetravalente con  
10   respecto a a un solo epítomo. Alternativamente, los dos pares de polipéptidos pueden ser diferentes. En tales modalidades en donde los dos pares de cadenas de polipéptidos son diferentes y los Dominios de VL y VH de cada par de polipéptidos reconocen epítomos diferentes (como se muestra por los sombreados y  
15   patrones diferentes en la **Figura 3C**), la molécula resultante posee cuatro sitios de unión al epítomo y es tetraespecífica y monovalente con respecto a cada epítomo enlazado. La **Figura 3A** muestra un diacuerpo que contiene la Región de Fc que contiene un péptido del Dominio Promotor de Heterodímeros que comprende  
20   un residuo de cisteína. La **Figura 3B** muestra un diacuerpo que contiene la Región de Fc, que contiene Dominios Promotores de Heterodímeros con hélice E y hélice K que comprenden un residuo de cisteína y un enlazador (con un residuo de cisteína opcional). La **Figura 3C**, muestra un diacuerpo que contiene la  
25   Región de Fc, el cual contiene dominios CH1 y CL de anticuerpo.

[0048] Las **Figuras 4A y 4B** proporcionan diagramas esquemáticos de una molécula de diacuerpo representativa enlazada de forma covalente que tiene dos sitios de unión al epítipo compuestos de tres cadenas de polipéptidos. Dos de las cadenas de polipéptidos poseen un Dominio de CH2 y CH3, de modo que las cadenas asociadas forman toda o parte de una Región de Fc. Las cadenas de polipéptidos comprenden el Dominio de VL y VH además comprenden un Dominio Promotor de Heterodímeros. Los Dominios de VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran utilizando el mismo patrón sombreado o de relleno.

[0049] La **Figura 5** proporciona el diagrama esquemático de una molécula de diacuerpo representativa enlazada de forma covalente que tiene cuatro sitios de unión al epítipo compuestos de cinco cadenas de polipéptidos. Dos de las cadenas de polipéptidos poseen un Dominio de CH2 y CH3, de modo que las cadenas asociadas forman una Región de Fc que comprende toda o parte de una Región de Fc. Las cadenas de polipéptidos comprenden los Dominios de VL y VH enlazados que además comprenden un Dominio Promotor de Heterodímeros. Los Dominios de VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran utilizando el mismo patrón sombreado o de relleno.

[0050] Las **Figuras 6A-6F** proporcionan diagramas esquemáticos de moléculas de unión trivalente representativas que contienen la Región Fc que tienen tres sitios de unión al epítipo. Las **Figuras 6A y 6B**, respectivamente, ilustran de

forma esquemática los dominios de las moléculas de unión trivalente que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo y un dominio de unión tipo Fab que tiene orientaciones de domino diferentes en las cuales los dominios de unión de tipo diacuerpo son N-terminales o C-terminales para una Región de Fc. Las moléculas en las **Figuras 6A y 6B** comprenden cuatro cadenas. Las **Figuras 6C y 6D**, respectivamente, ilustran de forma esquemática los dominios de las moléculas de unión trivalente que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo N-terminal a una Región de Fc, y un dominio de unión tipo Fab, o un dominio de unión tipo scFv. Las moléculas de unión trivalente en las **Figuras 6E y 6F** respectivamente, ilustran de forma esquemática los dominios de las moléculas de unión trivalente que comprenden dos dominios de unión de tipo diacuerpo C-terminal en una Región de Fc, y un dominio de unión tipo Fab en el cual la cadena ligera y cadena pesada se enlazan mediante un separador de polipéptidos, o un dominio de unión tipo scFv. Las moléculas de unión trivalente en las **Figuras 6C-6F** comprenden tres cadenas. Los Dominios de VL y VH que reconocen el mismo epítipo se muestran utilizando el mismo patrón sombreado o de relleno.

**[0051]** La **Figura 7** ilustra los principios de la presente invención al mostrar que una molécula biespecífica ejemplar (una molécula biespecífica de PD-1 x LAG-3, designada como DART A) es capaz de estimular la producción de citocina a niveles

mayores que aquellos observados después de la unión o administración combinada de los anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 progenitores. Se muestran los perfiles de secreción de IFN $\gamma$  de los PBMC a partir de un donador representativo,  
5 estimulado con SEB (0.5 ng/mL) y tratado con la molécula biespecífica ejemplar (Molécula biespecífica DART A de PD-1 x LAG-3) o con los anticuerpos de PD-1 x LAG-3 solos o en combinación.

[0052] Las **Figuras 8A-8D** muestran los resultados de los  
10 estudios ELISA que midieron la unión de las moléculas de unión diluidas en serie ten CTLA-4 de humano y PD-1 de humano. Las **Figuras 8A-8B** muestran las curvas de unión de mAb 3 de CTLA-4 G4P, DART D, TRIDENT A o DART B a hCTLA-4-Avi-His soluble (1  $\mu$ g/mL) (**Figura 8A**) o hPD-1-His (1  $\mu$ g/mL) (**Figura 8B**) que ha  
15 sido recubierto sobre placas de soporte. Se empleó anti-humano-Fc-HRP de cabra (1:10,000) como la molécula de detección secundaria para detectar la unión. Las **Figuras 8C-8D** muestran los resultados de un estudio sobre el efecto de alterar las orientaciones y dominios de unión en la unión. Las moléculas  
20 biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que comprenden los dominios de unión a CTLA-4 de mAb 1 de CTLA-4 (*por ejemplo*, DART B) y mAb 3 de CTLA-4 (*por ejemplo*, DART C y DART D) se incubaron en presencia de PD-1 de humano soluble (**Figura 8C**) o CTLA-4-Avi-His de humano soluble (**Figura 8D**), que ha sido recubierto sobre  
25 placas de soporte. Se empleó Fc $\gamma$ -HRP anti-humano de cabra como

la molécula de detección secundaria para detectar la unión que utiliza el sustrato quimioluminiscente PICO.

[0053] Las **Figuras 9A-9E** muestran los resultados de una evaluación de la capacidad de DART D, TRIDENT A, G4P de mAb 6 de PD-1, y G4P de mAb 3 de CTLA-4 y un tridente de control (que tiene dos sitios de unión para RSV y un sitio de unión para CTLA-4) para bloquear la unión del ligando de unión a PD-1 y CTLA-1, solos y en combinación. El bloqueo de la unión de PD-L1 a PD-1 se evaluó en presencia de cantidades iguales de un antígeno irrelevante (**Figura 9A**) y en presencia de cantidades iguales de CTLA-4 (**Figura 9B**), y el bloqueo de la unión de B7-1 a CTLA-4 se evaluó en presencia de cantidades iguales de un antígeno irrelevante (**Figura 9C**) y en presencia de cantidades iguales de PD-1 (**Figura 9D**) y en presencia de cuatro veces más PD-1 (**Figura 9E**) utilizando un ensayo ELISA.

[0054] Las **Figuras 10A-10B** muestran los resultados de una evaluación de la capacidad de DART B, DART D, TRIDENT A, los anticuerpos anti-CTLA-4 y mAb 1 de CTLA-4, G4P de mAb 3 de CTLA-4, y un anticuerpo de control de hIgG para unirse a células de CHO que expresan CTLA-4 de mono cynomolgus (**Figura 10A**) o CTLA-4 de humano (**Figura 10B**). La unión se detectó utilizando un anticuerpo secundario de Fc anti-humano.

[0055] Las **Figuras 11A-11B** muestran los resultados de una evaluación de la capacidad de DART C, DART D, DART E, TRIDENT A, los anticuerpos anti-CTLA-4 y mAb 1 de CTLA-4, G1AA de mAb

3 de CTLA-4, y el anticuerpo anti-PD-1 G4P de mAb 6 de PD-1 para unirse a células de Jurkat (que expresan huCTLA-4 pero no PD-1 en su superficie). La unión de las moléculas DART y TRIDENT a CTLA-4 de humano se detectó utilizando el Ab secundario de FC anti-humano (FACS). La **Figura 11A** muestra los resultados para DART C, DART D, DART E, MAb 1 de CTLA-4, G1AA de mAb 3 de CTLA-4, y G4P de mAb 6 de PD-1. La **Figura 11B** muestra los resultados para MAb 1 de CTLA-4, G1AA de mAb 3 de CTLA-4, G4P de mAb 6 de PD-1 y TRIDENT A.

10 **[0056]** Las **Figuras 12A-12B** muestran los resultados de una evaluación de la capacidad de DART D, TRIDENT A y los anticuerpos anti-CTLA-4 y mAb 1 de CTLA-4, G1AA de mAb 3 de CTLA-4 para bloquear los ligandos B7-1 y B7-2 de CTLA-4 en un ensayo a base de células. Los derivados B7-1 y B7-2 etiquetados con His se incubaron en presencia de las células de Jurkat y células que presentaban un antígeno artificial (Promega). La unión de His-B7-1 y His-B7-2 se detectó utilizando un anticuerpo anti-His. Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Figura 12A** (His-B7-1) y la **Figura 12B** (His-B7-2).

**[0057]** La **Figura 13** muestra los resultados de una evaluación de la capacidad de DART C, DART D, TRIDENT A, G1AA de mAb 3 de CTLA-4 y G4P de mAb 6 de PD-1 para invertirla señal de inhibición del punto de control inmune de CTLA-4 como se demuestra en un ensayo del reportero de IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-

4 por la expresión de luciferasa incrementada. Las células de IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-4 se incubaron en presencia de las moléculas de unión listadas (R:S= 1:0.3) durante 30 min a 37°C, tiempo en el cual se agregaron después células Raji que  
5 presentaban antígeno artificial y la incubación continuó durante 6 horas. La regresión de la señal de inhibición del punto de control inmune de CTLA-4 se determinó por el ensayo de luciferasa.

**[0058]** La **Figura 14** muestra los resultados de una evaluación de la capacidad de DART D, TRIDENT A, G4P de mAb 6 de PD-1, y  
10 G1AA de mAb 3 de CTLA-4 para unirse a células de NSO que expresaban PD-1 pero no CTLA-4. Las moléculas de unión se incubaron en presencia de las células y se midió el índice de fluorescencia media de las células.

**[0059]** Las **Figuras 15A-15B** muestran los resultados de una evaluación de la capacidad de DART D, TRIDENT A, G4P de mAb 6 de PD-1, y G1AA de mAb 3 de CTLA-4 para bloquear la unión entre PD-1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2 en un ensayo a base de células. PD-L1-PE o PD-L2-PE se incubó en presencia de tales  
15 moléculas de unión y su capacidad para unirse a las células de NSO-PD-1 se evaluó utilizando FACS. **Figura 15A** (PD-L1); **Figura 15B** (PD-L2).

**[0060]** La **Figura 16** muestra los resultados de una evaluación de la capacidad de DART D, TRIDENT A, G1AA de mAb 3 de CTLA-4,  
25 y G4P de mAb 6 de PD-1 para bloquear la inhibición inmune que

resulta de una interacción de PD-1 / PD-L1. Las moléculas de unión se incubaron en presencia de células efectoras de CHO de PD-L1<sup>+</sup> y de Jurkat, y se evaluó la capacidad de las moléculas de unión para bloquear la inhibición inmune (al bloquear la interacción de PD-1 / PD-L1) al seguir el grado de activación mediada por CD3 (como se demuestra por la expresión de luciferasa incrementada en el ensayo de NFAT-luc/Jurkat de PD-1; Promega).

[0061] La **Figura 17** muestra los resultados de una evaluación de la capacidad de DART D, TRIDENT A, y un diacuerpo de control negativo para co-ligar PD-1 y CTLA-4 en un ensayo de complementación del fragmento de enzima por DiscoverX. Las alícuotas de la línea celular #9 U2OS CTLA-4(1-195)-PK PD-1(1-199)-EA se sembraron en placas por cuadruplicado en 5,000 células/pozo en el medio para sembrado de placas CP5 de DiscoverX en placas de 384 pozos. A las células se les dejó unirse durante 4 horas a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5%. Se agregaron entonces 11 puntos en series de dilución 1:3 de cada una de las moléculas de unión a las células de PD-1-CTLA-4 y se agregaron muestras de DART D y TRIDENT A a las células de PD-1-LAG-3. Las placas se incubaron durante la noche (16 hrs) a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5%. Se agregó el reactivo de detección PathHunter a los pozos, los cuales entonces se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en la oscuridad, y después la placa se leyó en un luminómetro Envision.

[0062] La **Figura 18** muestra los resultados de una evaluación de la capacidad de DART D, TRIDENT A, G1AA de mAb 3 de CTLA-4, G4P de mAb 6 de PD-1 y las combinaciones de G1AA de mAb 3 de CTLA-4/G4P de mAb 6 de PD-1 (Combo 1 de Ab) para intensificar la respuesta de una Reacción Mezclada de Linfocitos. Las células dendríticas derivadas de monocitos se generaron al tratar monocitos de CD14+ con GM-CSF (proporcionado en el día 1 del período de incubación) e IL-4 (proporcionada en el día 7 del período de incubación). En el día 8 del período de incubación, se ajustó un MLR al incubar las células T de CD4+ con las células dendríticas derivadas de monocitos (proporcionadas en el día 8 del período de incubación) y las moléculas de unión anti-CTLA-4 y anti-PD-1 (proporcionadas en el día 8 del período de incubación). La liberación de IFN- $\gamma$  se graficó en la **Figura 18**. Se encontró que ambas moléculas biespecíficas de DART D y TRIDENT A intensificaron la respuesta MLR en el mismo grado o ligeramente mejor que la combinación de anticuerpos progenitores individuales. Los datos presentados comprenden siete series (cada una relacionada con una molécula de unión diferente: hIgG4 de control; G4P de mAb 6 de PD-1; G1AA de mAb 3 de CTLA-4; una combinación de G1AA de mAb 3 de CTLA-4/G4P de mAb 6 de PD-1 (Combo 1 de Ab); DART D; TRIDENT A; y una hIgG1 de control, respectivamente, de izquierda a derecha); cada serie se compone de seis columnas (cada una relacionada con una concentración diferente de la

molécula proporcionada: 0.016, 0.08, 0.4, 2, 10 o 50 nM, respectivamente, de izquierda a derecha).

[0063] Las **Figuras 19A-19D** muestran el efecto de la administración de DART D, TRIDENT A, GlAA de mAb 3 de CTLA-4, 5 G4P de mAb 6 de PD-1 y la combinación de MAb 1 de CTLA-4/PD-1 mAb 1 (Combo 1 de Ab) en respuestas de células T que utilizan un ensayo de estimulación con enterotoxina tipo B de *Staphylococcus aureus* (SEB). Las **Figuras 19A-19B** muestran gráficos de punto de la clasificación de células activadas por 10 fluorescencia (FACS) de la expresión de PD-1 contra CTLA-1 por tales PBMC en ausencia (**Figura 19A**) o presencia (**Figura 19B**) de la estimulación con SEB. La **Figura 19C** muestra el efecto de la estimulación con SEB en la secreción de IFN- $\gamma$ . Los PBMC se estimularon con enterotoxina tipo B de *Staphylococcus aureus* 15 (SEB) a 0.5 ng/ml durante 48 horas. Después las células se cosecharon, se lavaron y colocaron de Nuevo en placas en placas de 96 pozos con anticuerpos en diversas concentraciones con SEB recién preparada para 48 horas adicionales. El sobrenadante entonces se cosechó y analizó por ELISA con citometría de flujo 20 para la producción de IFN- $\gamma$ . Ambas proteínas biespecíficas de DART y TRIDENT mostraron un incremento en la respuesta de IFN- $\gamma$  que recapitula la respuesta observada con la combinación de los mAb progenitores individuales. Resultados similares se observaron en un ensayo de Estimulación con SEB en el cual los 25 PBMC se cultivaron con una alta concentración (500 ng/mL) de

SEB durante 72 horas. Se presentaron seis series, cada una relacionada con una molécula de unión diferente. Cada serie se componía de siete columnas, las cuales se relacionaron con el resultado obtenido con la molécula de unión a 25 nM, 6.25 nM, 1.56 nM, 0.39 nM, 0.09 nM, 0.02 nM o 0.006 nM (respectivamente, de izquierda a derecha). La **Figura 19D** muestra la liberación de IL-2 para un donador representativo. Los PBMC se estimularon con 0.5 ng/ml de SEB durante 48 horas, se cosecharon, se lavaron y volvieron de nuevo a sembrarse en placas en placas de 96 pozos con SEB recién preparada y ya sea DART D, TRIDENT A, G1AA de mAb 3 de CTLA-4, G4P de mAb 6 de PD-1 o la combinación de G1AA de mAb 3 de CTLA-4/G4P de mAb 6 de PD-1 (Combo 1 de Ab) durante 48 horas adicionales, y se midió la IL-2 liberada. Se presentaron siete series, cada una relacionada con una molécula o condición de unión diferente. Cada serie se componía de tres columnas, que se relacionaban con el resultado obtenido con la molécula de unión a 0.5 nM, 5 nM o 50 nM (respectivamente, de izquierda a derecha). Cuando se utilizaron anticuerpos en combinación, cada anticuerpo se agregó a la concentración indicada de modo que se duplicó la concentración total agregada del anticuerpo.

**[0064]** Las **Figuras 20A-20B** muestran la actividad de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 en un modelo de NOG de murino implantado en PBMC de Enfermedad de Injerto Contra Huésped (GVHD). Se realizaron conteos de células T de CD3+

mediante FACS en el día de estudio (**Figura 20A**) en ratones que recibieron DART D a una dosis de 50 mg/kg o 500 mg/kg (**Figura 20A**). La supervivencia se monitoreó durante el transcurso del estudio y se graficó como por ciento de supervivencia en la **Figura 20B**.

[0065] Las **Figuras 21A-21C** muestran los perfiles de tiempo de concentración en suero para monos cynomolgus (codificados utilizando un código alfanumérico de 6 caracteres) que recibieron DART D a 50 mg/kg en los días 1, 8 y 15 del estudio (**Figura 21A**), DART D a 75 mg/kg en los días 1, 8 y 15 del estudio (**Figura 21B**) o Trident A a 5 mg/kg en el día 1 (**Figura 21C**).

[0066] Las **Figuras 22A-22B** muestran el efecto de la administración de DART D en el conteo absoluto de linfocitos (ALC) en monos cynomolgus tratados. La **Figura 22A** muestra el ALC en miles de células/ $\mu$ l (th/ $\mu$ l). La **Figura 22B** muestra el por ciento de cambio en el ALC normalizado en el Día 1 (D1).

[0067] Las **Figuras 23A-23B** muestran la proliferación de células T de CD4+ y ocupación de PD-1 en células T en monos cynomolgus que recibieron DART D administrado a 50 mg/kg (**Figura 23A**) o DART D administrado a 75 mg/kg (**Figura 23B**).

[0068] Las **Figuras 24A-24B** muestran el efecto de la administración de DART D en la proliferación de células T de CD4+ en monos cynomolgus que recibieron DART D administrado a 50 mg/kg (**Figura 24A**) o DART D administrado a 75 mg/kg (**Figura**

**24B) .**

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0069]** La presente invención se dirige a moléculas  
5 biespecíficas (*por ejemplo, diacuerpos, anticuerpos*  
*biespecíficos, moléculas de unión trivalente, etc.*) que poseen  
al menos un sitio de unión al epítipo que es inmuno-específico  
para un epítipo de PD-1 y al menos un sitio de unión al epítipo  
que es inmuno-específico para un epítipo de CTLA-4 (*es decir,*  
10 una "molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4"). La presente  
invención se refiere a tales moléculas biespecíficas de PD-1 x  
CTLA-4 que poseen dos sitios de unión al epítipo que son  
inmuno-específicos para uno o dos epítipos de PD-1 y dos sitios  
de unión al epítipo que son inmuno-específicos para uno o dos  
15 epítipos de CTLA-4. La presente invención también se dirige a  
tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que comprenden  
adicionalmente una región Fc de inmunoglobulina. Las moléculas  
biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención son  
capaces de unirse de forma simultánea a PD-1 y a CTLA-4, en  
20 particular cuando tales moléculas se disponen en las  
superficies de las células humanas. La invención se dirige a  
composiciones farmacéuticas que contienen tales moléculas  
biespecíficas de PD-1 x CTLA-4, y a métodos que implican el  
uso de tales moléculas biespecíficas en el tratamiento de  
25 cáncer y otras enfermedades y padecimientos. La presente

invención también pertenece a métodos para utilizar tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 para estimular una respuesta inmune.

**[0070]** La activación de células T requiere dos señales  
5 diferentes (Viglietta, V. et al. (2007) "*Modulating Co-Stimulation*", Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) "*Checkpoint Blockade in Cáncer Immunotherapy*", Adv. Immunol. 90:297-339). La primera señal se proporciona por una molécula Receptora de Células T (TCR), expresada en la  
10 superficie de una célula T, que ha reconocido un antígeno peptídico que ha vuelto a asociarse con un antígeno leucocítico de humano (HLA) expresado en la superficie de una Célula que Presenta el Antígeno (APC). La segunda señal se proporciona por la interacción de pares cognados de ligandos de co-  
15 estimulación: B7-1 y B7-2 expresados en las APC y sus receptores correspondientes: CD28 y CTLA-4 expresados en células T.

**[0071]** La unión de las moléculas B7-1 y B7-2 en CD28 estimula la proliferación de células T e induce adicionalmente la  
20 expresión incrementada de CTLA-4. CTLA-4 es un regulador negativo que compite con B7-1 y B7-2 para unirse a CD28. De este modo, el proceso responde a la enfermedad en dos fases: la fase inicial implica estimular la proliferación de células T; la fase posterior de la respuesta inmune "viento abajo" y  
25 regresa al sujeto a un estado inmune quiescente. Los

anticuerpos que se unen a CD28 pueden mimetizar la unión de B7-1 o B7-2 y de este modo inducir o intensificar la función efectora de células T y la generación de inmunidad que erradica el tumor; tales anticuerpos son co-estimuladores. De forma

5 inversa, los anticuerpos que bloquean CTLA-4 a partir de la unión a B7-1 y B7-2 pueden evitar que las células T regresen a un estado quiescente; de este modo, tales células T mantienen una proliferación sostenida que puede llevar a la autoinmunidad y el desarrollo de eventos adversos inmunes relacionados (irAE)

10 (Wang, L. et al. (March 7, 2011) "*VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses*", J. Exp. Med. 10.1084/jem.20100619:1-16; Lepenies, B. et al. (2008) "*The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections*", Endocrine, Metabolic & Immune Disorders

15 - Drug Targets 8:279-288). De importancia particular es la unión entre los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) de la Célula que Presenta el Antígeno y los receptores CD28 y CTLA-4 del linfocito T de CD4+ (Sharpe, A.H. et al. (2002) "*The B7-CD28 Superfamily*", Nature Rev. Immunol. 2:116-126; Dong, C. et al.

20 (2003) "*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules*", Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation*", Immunol. Rev. 229:307-321). La unión de B7.1 o de B7.2 a CD28 estimula la activación de células T; la unión de B7.1 o B7.2 a

25 CTLA-4 inhibe tal activación (Dong, C. et al. (2003) "*Immune*

*Regulation by Novel Costimulatory Molecules"*, Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation", Immunol. Rev. 229:307-321; Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited", Ann. Rev. Immunol. 23:515-548). CD28 se expresa de forma constitutiva en la superficie de las células T (Gross, J., et al. (1992) "Identification and Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse", J. Immunol. 149:380-388), mientras que la expresión de CTLA-4 se sobrerregula rápidamente después de la activación de células T (Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 and Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement", Immunity 4:535-543). Puesto que CTLA-4 es el receptor de mayor afinidad (Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily", Nature Rev. Immunol. 2:116-126) la unión inicia primero la proliferación de células T (mediante CD28) y entonces la inhibe (mediante la expresión naciente de CTLA-4), amortiguando por lo tanto el efecto cuando la proliferación ya no es necesaria.

**[0072]** En paralelo con las interacciones descritas en lo anterior, un segundo conjunto de receptores y ligandos de unión funcionan para inhibir el sistema inmune, sirviendo de este modo como un freno para ralentizar la intensificación mediada por CD28/B7-1/B7-2 de la respuesta inmune. Esta respuesta auxiliar implica la unión del receptor de proteína de muerte 1 (PD-1) programado, expresada en la superficie de las células

T, en los ligandos correspondiente: PD-L1, expresado en las Células que Presentan el Antígeno (APC) y PD-L2, expresada en células epiteliales (Chen L. et al. (2013) "*Molecular Mechanisms Of T-Cell Co-Stimulation y Co-Inhibition*", Nature Reviews Immunology 13(4):227-242). En contraste con los anticuerpos agonistas que se unen a CD28 para estimular directamente las respuestas de las células T, los anticuerpos que se unen a cualquiera de PD-1 o PD-L1 antagonizan o bloquean el acoplamiento de PD-1/PD-L1 y de este modo mantienen la activación de células T al prevenir el suministro de una señal negativa en las células T. Como tal, los anticuerpos que se unen a cualquiera de PD-1 o PD-L1 aumentan o mantienen la proliferación de células T, citotoxicidad, y/o secreción de citocina. Los anticuerpos agonistas tomados juntos, tales como las rutas de señal positiva al objetivo anti-CD28 y por lo tanto son co-estimuladores, mientras que los anticuerpos antagonistas, tales como las rutas de señal negativa al objetivo anti-CTLA-4 y anti-PD-1, y se llamaron inhibidores de puntos de control.

**[0073]** Como se proporciona en lo anterior, CTLA-4 y PD-1 representan los inhibidores de los puntos de control canónicos ejercen efectos inhibidores distintos en la activación de células T. Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención son capaces de unirse a las moléculas de la superficie celular de PD-1 x CTLA-4 que se encuentran presentes

en las superficies de los linfocitos, y perjudicar por consiguiente la capacidad de tales moléculas de superficie celular para responder a sus receptores respectivos. Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo, la invención piensa  
5 que la unión a PD-1 puede liberar la inhibición de células T (*por ejemplo*, en los sitios del tumor y/o como resultado de la infección) y que la unión a CTLA-1 puede estimular la activación y estimulación policlonal. Como tal, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención son  
10 capaces de atenuar la inhibición del sistema inmune mediado por PD-1 y CTLA-4 y promover la activación continua del sistema inmune. Se ha demostrado en la presente que las moléculas biespecíficas que se dirigen a dos rutas de inmunomodulación son más potentes que la combinación de anticuerpos separados.  
15 La invención instantánea también proporciona moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que tienen relaciones de unión de PD-1:CTLA-4 de 1:1, 1:2, 2:2 y 2:1 lo cual permite el bloqueo completo de PD-1 y CTLA-4 así como el bloqueo que se sesga hacia CTLA-4 cuando se co-expresa con PD-1. En consecuencia,  
20 las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención proporcionan una superioridad inesperada en comparación con la combinación de los anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 separados. Adicionalmente, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención pueden  
25 proporcionar la estimulación inmune con un riesgo reducido de

irAE.

## **I. Anticuerpos y sus Dominios de Unión**

[0074] Los anticuerpos de la presente invención son  
5 moléculas de inmunoglobulina capaces de unirse específicas a  
un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido,  
polipéptido, *etc.*, a través de al menos un sitio de  
reconocimiento de antígeno, ubicado en el Dominio Variable de  
la molécula de inmunoglobulina. Como se utiliza en la presente,  
10 los términos "**anticuerpo**" y "**anticuerpos**" se refieren a  
anticuerpos monoclonales, anticuerpos multiespecíficos,  
anticuerpos de humano, anticuerpos humanizados, anticuerpos  
sintéticos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos policlonales,  
anticuerpos camelizados, los Fv de una sola cadena (scFv),  
15 anticuerpos de una sola cadena, fragmentos Fab, fragmentos  
(Fab'), Fv biespecíficos enlazados a disulfuro (scFv),  
intracuerpos, y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera  
de los anteriores. En particular, el término "anticuerpo"  
incluye moléculas de inmunoglobulina y fragmentos  
20 inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es  
*decir*, moléculas que contienen un sitio de unión al epítipo.  
Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo  
(*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*por  
ejemplo*, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>) o subclase. Como  
25 se utiliza en la presente, se dice que una Región de Fc es de

un isotipo, clase o subclase de IgG particular si su secuencia de aminoácidos es más homóloga que aquel isotipo en relación con otros isotipos de IgG. Además de sus usos conocidos en el diagnóstico, los anticuerpos han mostrado ser útiles como  
5 agentes terapéuticos. Los anticuerpos son capaces de unirse de forma inmuno-específica a un polipéptido o proteína o a una molécula que no es proteína debido a la presencia de un dominio o motivo o conformación en tal molécula (un "**epítopo**"). Una molécula que contiene epítopo puede tener actividad  
10 inmunogénica, de modo que obtenga una respuesta de producción de anticuerpos en un animal; tales moléculas se llaman "**antígenos**". En las últimas décadas se observó un renacimiento del interés en el potencial terapéutico de los anticuerpos, y los anticuerpos se han vuelto una de las clases líderes de  
15 fármacos derivados de la biotecnología (Chan, C.E. *et al.* (2009) "*The Use Of Antibodies in the Treatment of Infectious Diseases*", Singapore Med. J. 50(7):663-666). Se han aprobado cerca de 200 fármacos a base de anticuerpos para su uso o se encuentran en desarrollo.

20 **[0075]** El término "**anticuerpo monoclonal**" se refiere a una población de anticuerpos homogénea en donde el anticuerpo monoclonal se encuentra comprendido de aminoácidos (de origen natural y de origen no natural) que se implican en la unión selectiva de un antígeno. Los anticuerpos monoclonales son  
25 altamente específicos, se dirigen en contra de un solo epítopo

(o sitio antigénico). El término "anticuerpo monoclonal" no solo abarca anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), (scFv) de una sola cadena, mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad requerida y la capacidad para unirse a un antígeno. No pretende limitarse con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en la cual se elabora (*por ejemplo*, por hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.). El término incluye inmunoglobulinas completas así como los fragmentos, etc., descrito en lo anterior bajo la definición de "anticuerpo". Los métodos para elaborar anticuerpos monoclonales se conocen en la técnica. Un método que puede emplearse es el método de Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity", Nature 256:495-497 o una modificación del mismo. Típicamente, los anticuerpos monoclonales se desarrollan en ratones, ratas o conejos. Los anticuerpos se producen al inmunizar un animal con una cantidad inmunogénica de células, extractos de células o preparaciones de proteína que contienen el epítipo deseado. El inmunógeno

puede ser, pero no limitarse a, células primarias, líneas celulares cultivadas, células cancerosas, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos o tejido. Las células utilizadas para inmunización pueden cultivarse durante un período de tiempo

5 (por ejemplo, al menos 24 horas) antes de su uso como un inmunógeno. Las células pueden utilizarse como inmunógenos por ellas mismas o en combinación con un adyuvante no desnaturizante, tal como Ribi (véase, por ejemplo, Jennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody

10 Production", ILAR J. 37(3):119-125). En general, las células pueden mantenerse intactas y de preferencia viables cuando se utilizan como inmunógenos. Las células intactas pueden dejar antígenos que se detectan mejor que las células rotas por el animal inmunizado. El uso de adyuvantes de desnaturización

15 duros, por ejemplo, adyuvante de Freud, puede romper las células y rechazarlas de este modo. El inmunógeno puede administrarse múltiples veces en intervalos periódicos tales como, dos veces a la semana, o semanalmente, o puede administrarse de tal manera para mantener la viabilidad en el

20 animal (por ejemplo, en un tejido recombinante). Alternativamente, los anticuerpos monoclonales existentes y cualesquier otros anticuerpos equivalentes que sean inmuno-específicos para un epítipo patogénico deseado pueden secuenciarse y producirse de forma recombinante por cualesquier

25 medios conocidos en la técnica. En una modalidad, tal

anticuerpo se somete a secuenciación y la secuencia de polinucleótidos entonces se clona en un vector para su expresión y propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una  
5 célula huésped que después se expandirá y congelará para su uso futuro. La secuencia de polinucleótidos de tales anticuerpos puede utilizarse para manipulación genética y generar las moléculas monoespecíficas o multiespecíficas (*por ejemplo*, biespecíficas, triespecíficas y tetraespecíficas) de  
10 la invención, así como una afinidad optimizada, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y/o un anticuerpo canonizado, para mejorar la afinidad u otras características del anticuerpo. El principio general para humanizar un anticuerpo implica retener la secuencia básica de la porción  
15 de unión al antígeno de anticuerpo, mientras que se intercambia el resto no humano del anticuerpo con secuencias de anticuerpo de humano.

**[0076]** Los anticuerpos naturales (tales como anticuerpos de IgG) se componen de dos **Cadenas Ligeras** acomplejadas con dos  
20 **Cadenas Pesadas**. Cada Cadena Ligera contiene un Dominio Variable (**VL**) y un Dominio Constante (**CL**). Cada cadena pesada contiene un Dominio Variable (**VH**), tres Dominios Constantes (**CH1**, **CH2** y **CH3**), y una Región de Bisagra ubicada entre los Dominios **CH1** y **CH2**. La unidad básica estructural de las  
25 inmunoglobulinas de origen natural (*por ejemplo*, IgG) de este

modo es un tetrámero que tiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, expresadas usualmente como una glicoproteína de alrededor de 150,000 Da. La porción amino terminal ("N-terminal") de cada cadena incluye un Dominio Variable de  
5 alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal ("C-terminal") de cada cadena define una región constante, con cadenas ligeras que tienen un solo Dominio Constante y cadenas pesadas que usualmente tienen tres  
10 Dominios Constantes y una Región de Bisagra. De este modo, la estructura de las cadenas ligeras de una molécula de IgG es n-VL-CL-c y la estructura de las cadenas pesadas de IgG es n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (donde H es la Región de Bisagra, y n y c representan, respectivamente, el N-término y el C-término del  
15 polipéptido). Los Dominios Variables de una molécula de IgG consisten de las regiones determinantes de complementariedad (**CDR**), que contienen los residuos en contacto con el epítipo, y segmentos sin CDR, denominados como segmentos de marco (**FR**), los cuales en general mantienen la estructura y determinan la  
20 posición de los bucles de CDR a modo de permitir tal contacto (aunque ciertos residuos de marco también pueden tener contacto con el antígeno). De este modo, los Dominios de VL y VH tienen la estructura n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-c. Los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda  
25 y tercera CDR de una cadena ligera de anticuerpo se designan

respectivamente en la presente como **Dominio de CDR<sub>L</sub>1**, **Dominio de CDR<sub>L</sub>2**, y **Dominio de CDR<sub>L</sub>3**. De forma similar, los polipéptidos que son (o pueden servir como) la primera, segunda y tercera CDR de una cadena pesada de anticuerpo se designan

5 respectivamente en la presente como **Dominio de CDR<sub>H</sub>1**, **Dominio de CDR<sub>H</sub>2**, y **Dominio de CDR<sub>H</sub>3**. De este modo, los términos Dominio de CDR<sub>L</sub>1, Dominio de CDR<sub>L</sub>2, Dominio de CDR<sub>L</sub>3, Dominio de CDR<sub>H</sub>1, Dominio de CDR<sub>H</sub>2, y Dominio de CDR<sub>H</sub>3 se dirigen a polipéptidos que cuando se incorporan en una proteína provocan que la

10 proteína sea capaz de unirse a un epítipo específico con respecto a si tal proteína es un anticuerpo que tiene cadenas pesadas y ligeras o un diacuerpo o una molécula e unión de una sola cadena (*por ejemplo*, un scFv, un BiTe, *etc.*), o es otro tipo de proteína. En consecuencia, como se utiliza en la

15 presente, el término "**fragmento de unión al epítipo**" significa un fragmento de un anticuerpo capaz de unirse de forma inmuno-específica a un epítipo, y el término "**sitio de unión al epítipo**" se refiere a una porción de una molécula que comprende un fragmento de unión al epítipo. Un fragmento de unión al

20 epítipo puede contener 1, 2, 3, 4, 5 o los 6 Dominios de CDR de tal anticuerpo y, aunque son capaces de unirse de forma inmuno-específica a tal epítipo, puede mostrar una inmuno-especificidad, afinidad o selectividad hacia tal epítipo que difiere de aquel de tal anticuerpo. De preferencia, sin

25 embargo, un fragmento de unión al epítipo contendrá los 6

Dominios de CDR de tal anticuerpo. Un fragmento de unión al epítopo de un anticuerpo puede ser una sola cadena de polipéptidos (*por ejemplo*, un scFv), o puede comprender dos o más cadenas de polipéptidos, cada una tiene un término amino y un término carboxi (*por ejemplo*, un diacuerpo, un fragmento Fab, un fragmento Fab<sub>2</sub>, etc.). A menos que se observe específicamente, el orden de los dominios de las moléculas de proteína descritas en la presente se encuentra de dirección N-terminal a dirección C-terminal.

10   **[0077]**   La invención en particular abarca las moléculas biespecíficas de unión de PD-1 x CTLA-4 que comprenden uno, dos, o más de dos fragmentos de Dominio Variable de una sola cadena ("**scFv**") de un anticuerpo anti-PD-1 y uno, dos, o más de dos fragmentos de Dominio Variable de una sola cadena de un anticuerpo anti-CTLA-4. Los fragmentos de Dominio Variable de una sola cadena se elaboran al enlazar los Dominios Variables de Cadena Ligera y Pesada utilizando un péptido de enlace corto. Los enlazadores pueden modificarse para proporcionar funciones adicionales, tales como permitir la unión de fármacos o la unión a soportes sólidos. Las variantes de una sola cadena pueden producirse ya sea de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede utilizarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contenga el polinucleótido que codifica el scFv en una célula huésped

15

20

25

adecuada, ya sea eucariótica, tal como células de levadura, planta, insecto o mamífero, o procariótica, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden elaborarse por manipulaciones de rutina tales como ligadura de  
5 polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse utilizando técnicas de purificación de proteína estándar conocidas en el arte.

**[0078]** La invención también abarca en particular moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que comprenden anticuerpos anti-  
10 PD-1 y anti-CTLA-4 humanizados. El término anticuerpos "**humanizados**" se refiere a una molécula quimérica, preparada en general utilizando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión al antígeno de una inmunoglobulina de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina restante  
15 de la molécula que se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. La secuencia de polinucleótidos de los Dominios Variables de tales anticuerpos puede utilizarse para manipulación genética para generar tales derivados y mejorar la afinidad u otras características de tales  
20 anticuerpos. El principio general en humanizar un anticuerpo implica retener la secuencia básica de la porción de unión al antígeno del anticuerpo, mientras que intercambia las secuencias del anticuerpo restante no humano con las del anticuerpo de humano. Existen cuatro etapas generales para  
25 humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar

el nucleótido y secuencia de aminoácidos predicha de los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo de inicio; (2) designar el anticuerpo humanizado o anticuerpo canonizado, es decir, decidir qué región de marco de anticuerpo  
 5 utilizar durante el proceso de humanización o canonización; (3) las metodologías/técnicas de humanización o canonización actuales; y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; y 6,331,415.

10 **[0079]** El sitio de unión al antígeno puede comprender ya sea un Dominio Variable completo fusionado sobre los Dominios Constantes o únicamente a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de tal Dominio Variable injertado en regiones de marco apropiadas. Los sitios de unión al antígeno  
 15 pueden ser de tipo silvestre o modificarse por una o más sustituciones de aminoácidos. Esto elimina la región constante como un inmunógeno en individuos humanos, pero permanece la posibilidad de una respuesta inmune al Dominio Variable extraño (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "*Mouse/Human Chimeric monoclonal*  
 20 *Antibody In Man: Kinetics and immune Response*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Otro procedimiento no solo se enfoca en proporcionar regiones constantes derivadas de humano, sino modificar los Dominios Variables así como reconformarlos tan cerca como sea posible en la forma humana.  
 25 Se sabe que los Dominios Variables de las cadenas ligeras y

pesadas contienen tres regiones determinantes de la  
 complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos  
 en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas  
 por cuatro regiones de marco (FR) que relativamente se  
 5 conservan en una especie dada y que proporcionan de forma  
 putativa un andamiaje para las CDR. Cuando se preparan  
 anticuerpos que no son de humano con respecto a un antígeno  
 particular, los Dominios Variables pueden "reconformarse" o  
 "humanizarse" al injertar las CDR derivadas de un anticuerpo  
 10 que no es de humano en las FR presentes en el anticuerpo de  
 humano que se va a modificar. La aplicación de este  
 procedimiento en diversos anticuerpos se ha reportado por Sato,  
 K. et al. (1993) *Cáncer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al.  
 (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", *Nature*  
 15 332:323-327; Verhoeven, M. et al. (1988) "Reshaping Human  
 Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", *Science*  
 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization  
 Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance  
 Of Framework Residues On Loop Conformation", *Protein*  
 20 *Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction  
 Of Reshaped Human Antibodies with VIH-Neutralizing Activity",  
*Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al.  
 (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody", *Proc. Natl.*  
*Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991)  
 25 "Reshaping A Human Antibody monoclonal To Inhibit Human

*Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo*", Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Human Antibodies For Antiviral Therapy", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-  
5 *p185her2 Antibody For Human Cáncer Therapy*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; y Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric and Humanized Antibodies with Specificity For The CD33 Antigen", J. Immunol. 148:1149-1154. En algunas modalidades, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de  
10 CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras modalidades, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, o seis) que difieren en secuencia en relación con el anticuerpo original.

15 **[0080]** Se ha descrito un número de moléculas de anticuerpo "humanizado" que comprende un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen el Dominio Variable de roedor o de roedor modificado y sus regiones determinantes de  
20 complementariedad (CDR) asociadas y fusionadas a los Dominios Constantes de humano (véase, por ejemplo, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies", Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics and Immune Response", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)  
25 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A

*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen*", J. Immunol. 138:4534-4538, y Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody", Cáncer Res. 47:3577-3583). Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región de marco (FR) de soporte de humano antes de la fusión con un Dominio Constante de anticuerpo de humano apropiado (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy", Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity", Science 239:1534-1536; y Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody with Those From A Mouse", Nature 321:522-525). Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por las regiones de marco de roedor recubiertas de manera recombinante. Véase, por ejemplo, Publicación Europea de Patente No. 519,596. Estas moléculas "humanizadas" se designaron para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia las moléculas de anticuerpos anti-humano de ratón, que limita la duración y efectividad de aplicaciones terapéuticas de aquellos motivos en receptores humanos. Otros métodos para humanizar anticuerpos que también pueden utilizarse se describen por Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, and Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody

*Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins",*  
 Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 y en las Patentes de los Estados  
 Unidos Nos. 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; y 5,866,692.

## 5    **II. Receptores de Fc $\gamma$ (Fc $\gamma$ R)**

[0081]    Los Dominios de CH2 y CH3 de las dos cadenas pesadas  
 interactúan para formar la Región de Fc, que es un dominio que  
 se reconoce por los **Receptores de Fc** celulares, incluyendo pero  
 no limitándose a Receptores gamma de Fc (**Fc $\gamma$ R**). Como se utiliza  
 10 en la presente, el término "Región de Fc" se utiliza para  
 definir una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. La  
 secuencia de aminoácidos del Dominio de CH2-CH3 de una IgG1 de  
 humano ejemplar es (**SEQ ID NO:1**):

|    |            |            |            |             |            |     |
|----|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
|    | 231        | 240        | 250        | 260         | 270        | 280 |
| 15 | APELLGGPSV | FLFPPKPKDT | LMISRTPEVT | CVVVVDVSHED | PEVKFNWYVD |     |
|    | 290        | 300        | 310        | 320         | 330        |     |
|    | GVEVHNAKTK | PREEQYNSTY | RVVSVLTVLH | QDWLNGKEYK  | CKVSNKALPA |     |
|    | 340        | 350        | 360        | 370         | 380        |     |
|    | PIEKTISKAK | GQPREPQVYT | LPPSREEMTK | NQVSLTCLVK  | GFYPSDIAVE |     |
| 20 | 390        | 400        | 410        | 420         | 430        |     |
|    | WESNGQPENN | YKTTTPVLDS | DGSFFLYSKL | TVDKSRWQQG  | NVFSCSVME  |     |
|    | 440        | 447        |            |             |            |     |
|    | ALHNHYTQKS | LSLSPG     | <b>X</b>   |             |            |     |

como se numera por el índice EU como se establece en Kabat,  
 25 en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[0082]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de CH2-CH3 de una IgG2 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:2**):

```

231    240    250    260    270    280
APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
5      290    300    310    320    330
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
      340    350    360    370    380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
      390    400    410    420    430
10    WESNGQPENN YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
      440    447
ALHNHYTQKS LSLSPGX

```

como se numera por el índice EU como se establece en Kabat, en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

15 **[0083]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de CH2-CH3 de una IgG3 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:3**):

```

231    240    250    260    270    280
APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
      290    300    310    320    330
20    GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
      340    350    360    370    380
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
      390    400    410    420    430
      WESSGQPENN YNTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE
25      440    447

```

ALHNRFTQKS LSLSPGX

como se numera por el índice EU como se establece en Kabat,  
en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[0084]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de CH2-CH3

5 de una IgG4 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:4**):

231 240 250 260 270 280

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD

290 300 310 320 330

GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS

10 340 350 360 370 380

SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPQSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE

390 400 410 420 430

WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME

440 447

15 ALHNHYTQKS LSLSLGX

como se numera por el índice EU como se establece en Kabat,  
en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[0085]** A través de toda la especificación actual, la

numeración de los residuos en la región constante de una cadena  
20 pesada de IgG es aquella del índice EU como en Kabat *et al.*,

SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª Ed. Public Health  
Service, NH1, MD (1991) ("Kabat"), se incorpora expresamente

en la presente para referencia. El término "índice EU como en  
Kabat" se refiere a la numeración del anticuerpo EU e IgG1 de

25 humano. Los aminoácidos de los Dominios Variables de las

cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina madura se designaron por la posición de un aminoácido en la cadena. Kabat describe numerosas secuencias de aminoácidos para anticuerpos, identifica una secuencia de consenso de aminoácidos para cada subgrupo, y se asigna un número de residuo a cada aminoácido, y las CDR se identifican como se define por Kabat (se entenderá CDR<sub>H1</sub> como se define por Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "*Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins*", J. Mol. Biol. 196:901-917) siendo cinco residuos al inicio). El esquema de numeración de Kabat puede extenderse a anticuerpos no incluidos en este compendio al alinear el anticuerpo en cuestión con una de las secuencias de consenso en Kabat con referencia a los aminoácidos conservados. Este método para asignar números de residuo se ha vuelto estándar en el campo e identifica fácilmente aminoácidos en posiciones equivalentes en anticuerpos diferentes, incluyendo variantes humanizadas o quiméricas. Por ejemplo, un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo de humano ocupa la posición equivalente para un aminoácido en la posición 50 de una cadena ligera de anticuerpo de ratón.

**[0086]** Se han observado polimorfismos en un número de posiciones diferentes dentro de las regiones constantes de anticuerpo (*por ejemplo*, posiciones de Fc, que incluyen pero no se limitan a las posiciones 270, 272, 312, 315, 356, y 358 como se numera por el índice EU como se establece en Kabat), y

de este modo pueden existir leves diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias de la técnica anterior. Las formas polimórficas de inmunoglobulinas de humano han sido bien caracterizadas. En la actualidad, se conocen 18 alotipos

5 Gm: G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., "The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function and Regulation." Pergamon, Oxford, pp. 43-

10 78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Esto contempla específicamente que los anticuerpos de la presente invención pueden incorporar cualquier alotipo, isoalotipo, o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina, y no se limitan al alotipo, isoalotipo o haplotipo de las

15 secuencias proporcionadas en la presente. Además, en algunos sistemas de expresión el residuo de aminoácido C-terminal (en negritas anterior) del Dominio de CH3 puede retirarse de forma post-traductorial. En consecuencia, el residuo C-terminal del Dominio de CH3 es un residuo de aminoácidos opcional en las

20 moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención. Se abarcan específicamente por la invención instantánea moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que carecen del residuo C-terminal del Dominio de CH3. También se abarcan específicamente por la invención instantánea tales constructos que comprenden

25 el residuo de lisina C-terminal del Dominio de CH3.

**[0087]** Como se establece en lo anterior, la Región de Fc de los anticuerpos de IgG naturales es capaz de unirse a los Receptores gamma de Fc celulares (FcγR). Tal unión resulta en la transducción de las señales de activación o inhibición en el sistema inmune. La capacidad de tal unión resulta en funciones que se oponen diametralmente y refleja las diferencias estructurales entre los FcγR diferentes, y en particular refleja si el enlace de FcγR posee un motivo de activación a base de tirosina inmunorreceptor (ITAM) o un motivo inmunorreceptor inhibidor a base de tirosina (ITIM). El reclutamiento de enzimas citoplásmicas diferentes de estas estructuras indica el resultado de las respuestas celulares mediadas por FcγR. Los FcγR que contienen ITAM incluyen FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIA, y activan el sistema inmune cuando se unen a una Región de Fc. FcγRIIB es actualmente el único FcγR que contiene ITIM natural conocido; actúa para amortiguar o inhibir el sistema inmune cuando se enlaza a una Región de Fc. Los neutrófilos de humano expresan el gen FcγRIIA. El agrupamiento de FcγRIIA mediante complejos inmunes o el entrecruzamiento específico de anticuerpos sirve para agregar los ITAM con cinasas asociadas al receptor que facilitan la fosforilación de ITAM. La fosforilación de ITAM sirve como un sitio de acoplamiento para Syk cinasa, la activación de la cual resulta en la activación de sustratos corriente abajo (*por ejemplo*, PI<sub>3</sub>K). La activación celular lleva a la liberación de

mediadores proinflamatorios. El gen FcγRIIB se expresa en linfocitos B; su dominio extracelular es 96% idéntico a FcγRIIA y une complejos de IgG de una manera indistinguible. La presencia de un ITIM en el dominio citoplásmico de FcγRIIB define esta subclase inhibidora de FcγR. De forma reciente, se estableció la base molecular de esta inhibición. Cuando se coliga junto con un FcγR de activación, el ITIM en FcγRIIB se vuelve fosforilado y atrae el dominio de SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como una consecuencia de la activación de tirosina cinasa mediada por FcγR que contiene ITAM, evitando en consecuencia el flujo de entrada de Ca<sup>++</sup> intracelular. De este modo, la reticulación de FcγRIIB amortigua la respuesta de activación en la ligadura de FcγR e inhibe la sensibilidad celular. De este modo se aborta la activación de células B, proliferación de células B y secreción de anticuerpos.

### **III. Anticuerpos biespecíficos, Diacuerpos Multiespecíficos y Diacuerpos DART®**

[0088] La capacidad de un anticuerpo para unir un epítopo de un antígeno depende de la presencia y secuencia de aminoácidos de los Dominios de VL y VH del anticuerpo. La interacción de la cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo y, en particular, la interacción de sus Dominios de

VL y VH forma uno de los dos sitios de unión al epítopo de un anticuerpo natural, tal como una IgG. Los anticuerpos naturales son capaces de unirse únicamente a una especie de epítopo (es decir, son monoespecíficos), aunque pueden unirse a múltiples copias de esa especie (es decir, mostrando bivalencia o multivalencia).

[0089] Los dominios de unión de un anticuerpo y de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 en la presente invención, se unen a los epítopos de una manera "inmunoespecífica". Como se utiliza en la presente, se dice que un anticuerpo, diacuerpo u otra molécula de unión al epítopo que une "inmunoespecíficamente" una región de otra molécula (es decir, un epítopo) si reacciona o se asocia de modo más frecuente, más rápido, con mayor duración y/o con mayor afinidad con ese epítopo en relación con los epítopos alternativos. Por ejemplo, un anticuerpo que se une de forma inmunoespecífica a un epítopo viral es un anticuerpo que une este epítopo viral con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que el que se une de forma inmunoespecífica a otros epítopos virales o epítopos no virales. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o porción o epítopo) que se une de forma inmunoespecífica a un primer objetivo o puede o no unirse de forma específica o de preferencia a un segundo objetivo. Como tal, la "unión inmunoespecífica" no requiere

necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva. Generalmente, pero no de forma necesaria, la referencia a la unión significa unión "inmunoespecífica". Se dice que dos moléculas son capaces de unirse entre sí de una manera  
5 "**fisioespecífica**", si tal unión muestra la especificidad con tales receptores unidos a sus ligandos respectivos.

[0090] Un aspecto de la presente invención refleja el reconocimiento de que la funcionalidad de los anticuerpos puede intensificarse al generar moléculas multiespecíficas a base  
10 del anticuerpo que pueden unirse de forma simultánea a uno o más epítopos de PD-1 y también a uno o más epítopos de CTLA-4. Para moléculas que tienen más de un sitio de unión al epítipo inmunoespecífico para un epítipo de PD-1, tales epítopos pueden ser idénticos entre sí, solaparse, o distinguirse entre sí; la  
15 unión a uno de tal epítipo puede competir con o no competir con la unión a otro de tales epítopos. De forma similar, para moléculas que tienen más de un sitio de unión al epítipo inmunoespecífico para un epítipo de CTLA-4, tales epítopos pueden ser idénticos entre sí, solaparse, o distinguirse entre  
20 sí; la unión a uno de tal epítipo puede competir con o no competir con la unión al segundo de tales epítopos. Se contempla expresamente que tales características pueden variar de forma independiente para producir moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que, por ejemplo, poseen:

25 (1) la capacidad para unirse a dos epítopos idénticos de

PD-1 y a:

- (a) dos epítomos idénticos de CTLA-4; o
- (b) dos epítomos superpuestos de CTLA-4; o
- (c) dos epítomos distintos de CTLA-4;

5 o

(2) la capacidad para unirse a dos epítomos superpuestos de

PD-1 y a:

- (a) dos epítomos idénticos de CTLA-4; o
- (b) dos epítomos superpuestos de CTLA-4; o
- 10 (c) dos epítomos distintos de CTLA-4;

o

(3) la capacidad para unirse a dos epítomos distintos de

PD-1 y a:

- (a) dos epítomos idénticos de CTLA-4; o
- 15 (b) dos epítomos superpuestos de CTLA-4; o
- (c) dos epítomos distintos de CTLA-4.

**[0091]** Para proporcionar moléculas que tienen mayor capacidad que los anticuerpos naturales, se ha desarrollado una amplia variedad de formatos de anticuerpos biespecíficos recombina-  
 20 ntes (véase, *por ejemplo*, Publicaciones PCT Nos. WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), la mayoría de los cuales utiliza péptidos enlazadores ya sea para fusionar aún más un fragmento de unión al epítomo (*por ejemplo*, un scFv, VL, VH, etc.) a, o dentro del núcleo del anticuerpo (IgA, IgD,  
 25

IgE, IgG o IgM), o para fusionar múltiples fragmentos de unión al epítopo (*por ejemplo*, dos fragmentos Fab o scFv). Los formatos alternativos utilizan péptidos enlazadores para fusionar un fragmento de unión al epítopo (*por ejemplo*, un  
5 scFv, VL, VH, *etc.*) en un dominio de dimerización tal como el Dominio de CH2-CH3 o polipéptidos alternativos (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Las Publicaciones PCT Nos. WO 2013/174873, WO 2011/133886 y WO 2010/136172 describen un anticuerpos triespecífico en el cual  
10 los Dominios CL y CH1 se cambian de sus posiciones naturales respectivas y los Dominios de VL y VH se han diversificado (WO 2008/027236; WO 2010/108127) para permitirles unirse a más de un antígeno. Las Publicaciones PCT Nos. WO 2013/163427 y WO 2013/119903 describen modificar el Dominio de CH2 para contener  
15 un aducto de proteína de fusión que comprende un dominio de unión. Las Publicaciones PCT Nos. WO 2010/028797, WO2010028796 y WO 2010/028795 describen anticuerpos recombinantes cuyas Regiones de Fc han sido remplazadas con Dominios de VL y VH adicionales, a modo de formar moléculas de unión trivalente.  
20 Las Publicaciones PCT Nos. WO 2003/025018 y WO2003012069 describen diacuerpos recombinantes cuyas cadenas individuales contienen Dominios de scFv. Las Publicaciones PCT No. WO 2013/006544 describen moléculas de Fab multivalentes que se sintetizan como una sola cadena de polipéptidos y entonces se  
25 someten a proteólisis para producir estructuras

heterodiméricas. Las Publicaciones PCT Nos. WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2008/024188, WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 y WO 1991/003493 describen agregar dominios de  
 5 unión adicionales o grupos funcionales en un anticuerpo o una porción de anticuerpo (*por ejemplo*, agregar un diacuerpo en la cadena ligera del anticuerpo, o agregar Dominios de VL y VH adicionales en las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, o agregar una proteína de fusión heteróloga o cambiar múltiples  
 10 Dominios de Fab entre sí).

**[0092]** La técnica ha observado adicionalmente la capacidad de producir diacuerpos que difieren de tales anticuerpos naturales en ser capaces de unir dos o más especies de epítomos diferentes (*es decir*, que muestran biespecificidad o  
 15 multiespecificidad además de bivalencia o multivalencia) (véase, *por ejemplo*, Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent and Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 / WO 02/02781 (Mertens et al.); Alt et al.  
 20 (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.);  
 25 Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA

*Diabody Allows Site-Specific Conjugation and Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*", Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through  
 5 Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy and Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Resumen 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific  
 10 Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cáncer Res. 69(12):4941-4944).

**[0093]** El diseño de un diacuerpo se basa en el derivado de anticuerpo conocido como un fragmento de Dominio Variable de  
 15 una sola cadena (**scFv**). Tales moléculas se elaboran al enlazar los Dominios Variables de cadena ligera y/o pesada que utilizan un péptido de enlace corto. Bird et al. (1988) ("*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*", Science 242:423-426) describe el ejemplo de los péptidos enlazadores que hacen un puente de  
 20 aproximadamente 3.5 nm entre el término carboxi de un Dominio Variable y el término amino del otro Dominio Variable. Se han designado y utilizado enlazadores de otras secuencias (Bird et al. (1988) "*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*", Science 242:423-426). A su vez, los enlazadores pueden modificarse para  
 25 funciones adicionales, tales como la unión de fármacos o la

unión a soportes sólidos. Las variantes de una sola cadena pueden producirse ya sea de forma recombinante o sintética. Para la producción sintética de scFv, puede utilizarse un sintetizador automatizado. Para la producción recombinante de  
5 scFv, puede introducirse un plásmido adecuado que contiene un polinucleótido que codifica el scFv en una célula huésped aceptable, ya sea eucariótica, tal como células de levadura, planta, insecto o mamífero, o procariótica, tal como *E. coli*. Los polinucleótidos que codifican el scFv de interés pueden  
10 elaborarse por manipulaciones de rutina tal como la ligadura de polinucleótidos. El scFv resultante puede aislarse utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas conocidas en el arte.

**[0094]** La condición de las moléculas biespecíficas de unión  
15 (*por ejemplo*, diacuerpos no monoespecíficos) proporciona una ventaja significativa sobre los anticuerpos, incluida pero no limitada a, una capacidad de unión "trans" suficiente para co-ligar y/o co-localizar células diferentes que expresan epítopos diferentes y/o una capacidad de unión "cis" suficiente para  
20 co-ligar y/o co-localizar moléculas diferentes expresadas por la misma célula. Las moléculas biespecíficas de unión (*por ejemplo*, diacuerpos no monoespecíficos) de este modo tienen aplicaciones de amplio alcance que incluyen terapia e inmunodiagnóstico. La biespecificidad permite mayor  
25 flexibilidad en el diseño e ingeniería del diacuerpo en

diversas aplicaciones, proporcionando una avidéz intensificada para antígenos multiméricos, el entrecruzamiento de antígenos que difieren, y el objetivo dirigido a tipos celulares específicos que se apoya en la presencia de ambos antígenos  
 5 objetivo. Debido a su Valencia incrementada, las bajas tasas de disociación y rápida eliminación de la circulación (para diacuerpos de tamaño pequeño, en o debajo de ~50 kDa), las moléculas de diacuerpo conocidas en la técnica también han mostrado uso particular en el campo de la formación de imágenes  
 10 de tumor (Fitzgerald et al. (1997) "*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*", Protein Eng. 10:1221).

**[0095]** La capacidad de producir diacuerpos biespecíficos ha llevado a su uso (en "trans") para co-ligar dos células juntas,  
 15 por ejemplo, al co-ligar receptores que se encuentran presentes en la superficie de células diferentes (por ejemplo, células T citotóxicas reticuladas en células de tumor) (Staerz et al. (1985) "*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*", Nature 314:628-631, y Holliger et al. (1996) "*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*", Protein Eng. 9:299-305; Marvin et al. (2005) "*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658). Alternativa o  
 20 adicionalmente, pueden utilizarse diacuerpos biespecíficos (en  
 25 "cis") para co-ligar moléculas, tales como receptores, etc.,

que se encuentran presentes en la superficie de la misma célula. La co-ligadura de células y/o receptores diferentes es útil para las funciones efectoras de modulación y/o señalización de células inmunes. Sin embargo, las ventajas  
5 anteriores tienen un costo relevante. La formación de tales diacuerpos no monoespecíficos requiere del ensamblaje exitoso de dos o más polipéptidos distintos y diferentes (*es decir*, tal formación requiere que los diacuerpos se formen a través de la heterodimerización de especies de cadenas de polipéptidos  
10 diferentes). Este hecho es en contraste con los diacuerpos monoespecíficos, que se forman a través de la homodimerización de cadenas de polipéptidos idénticas. Debido a que deben proporcionarse al menos a dos polipéptidos distintos (*es decir*, dos especies de polipéptidos) para formar un diacuerpo no  
15 monoespecífico, y debido a que la homodimerización de tales polipéptidos lleva a moléculas inactivas (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588), la producción de tales polipéptidos debe obtenerse de  
20 tal manera para evitar el enlace covalente entre polipéptidos de la misma especie (*es decir*, a modo de prevenir la homodimerización) (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588). Por lo tanto,  
25 la técnica ha enseñado la asociación no covalente de tales

polipéptidos (véase, por ejemplo, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA diabody Allows Site-Specific Conjugation and Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy and Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain", Resumen 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

**[0096]** Sin embargo, la técnica ha reconocido que los diacuerpos biespecíficos compuestos de polipéptidos no asociados de forma covalente son inestables y se disocian fácilmente en monómeros no funcionales (véase, por ejemplo, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor and The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

**[0097]** En cara a este desafío, la técnica ha tenido éxito en desarrollar diacuerpos heterodiméricos no monoespecíficos unidos de forma covalente, llamados diacuerpos **DART® (Reactivos**

**de Redirección de Afinidad Doble**); véase, por ejemplo, Publicaciones de Patente de los Estados Unidos No. 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y

5 Publicaciones PCT No. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; y Sloan, D.D. et al. (2015) "*Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind VIH Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells*", PLoS Pathog. 11(11):e1005233. doi:

10 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. et al. (2015) "*Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART®) Platform*", Blood pii: blood-2014-05-575704; Chichili, G.R. et al. (2015) "*A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity and Safety In Nonhuman Primates*", Sci.

15 Transl. Med. 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*", Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function with A Novel Bispecific Antibody Scaffold*", Arthritis Rheum. 62(7):1933-

20 1943; Johnson, S. et al. (2010) "*Effector Cell Recruitment with Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis and in vivo B-Cell Depletion*", J. Mol.

25

Biol. 399(3):436-449). Tales diacuerpos comprenden dos o más polipéptidos acomplexados de forma covalente e implican el diseño de uno o más residuos de cisteína en cada una de las especies de polipéptidos empleadas que permiten enlaces  
 5 disulfuro para formar y de este modo unen de forma covalente uno o más pares de tales cadenas de polipéptidos entre sí. Por ejemplo, la adición de un residuo de cisteína en el C-término de tales constructos ha mostrado dejar enlaces disulfuro entre las cadenas de polipéptidos implicadas, estabilizando el  
 10 diacuerpo resultante sin interferir con las características de unión del diacuerpo.

**[0098]** Se han descrito muchas variaciones de tales moléculas (véase, *por ejemplo*, Publicaciones de Patente de los Estados Unidos No. 2015/0175697; 2014/0255407; 2014/0099318;  
 15 2013/0295121; 2010/0174053; 2009/0060910; 2007-0004909; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221; EP 1868650; y Publicaciones PCT No. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; WO 2006/113665) y se proporcionan en la presente.

20 **[0099]** Los constructos alternativos se conocen en la técnica para aplicaciones donde una molécula tetravalente se desea pero no se requiere un Fc que incluye, pero no se limita a, anticuerpos en tándem tetravalentes, también denominados como "**TandAbs**" (véase, *por ejemplo* Publicaciones de Patente de los  
 25 Estados Unidos Nos. 2005-0079170, 2007-0031436, 2010-0099853,

2011-020667 2013-0189263; Publicación de Patente Europea Nos. EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 y EP 1293514; Publicaciones PCT Nos. WO 1999/057150, WO 2003/025018, y WO 2013/013700) los cuales se forman por la homodimerización de cada una de las  
5 dos cadenas idénticas que poseen un Dominio de VH1, VL2, VH2, y VL2.

#### **IV. Moléculas Biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 Preferidas**

[00100] Una modalidad de la presente invención se relaciona  
10 con moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que son capaces de unirse a un **"primer epítipo"** y un **"segundo epítipo"**, tales epítipos no son idénticos entre sí. Tales moléculas biespecíficas comprenden los dominios de **"VL1"/"VH1"** que son capaces de unirse al primer epítipo y los dominios de  
15 **"VL2"/"VH2"** que son capaces de unirse al segundo epítipo. Las notaciones **"VL1"** y **"VH1"** denotan respectivamente, el Dominio Variable de Cadena Ligera y el Dominio Variable de Cadena Pesada que unen el "primer" epítipo de tales moléculas biespecíficas. De forma similar, las notaciones de **"VL2"** y  
20 **"VH2"** denotan respectivamente, el Dominio Variable de Cadena Ligera y el Dominio Variable de Cadena Pesada que se unen al "segundo" epítipo de tales moléculas biespecíficas. Es irrelevante si un epítipo particular se designa como el primer epítipo contra el segundo epítipo; tales notaciones tienen  
25 relevancia únicamente con respecto a la presencia y orientación

de los dominios de las cadenas de polipéptidos de las moléculas de unión de la presente invención. En una modalidad, uno de tales epítopos es un epítipo de PD-1 de humano y el otro de tales epítopos es un epítipo de CTLA-4. En ciertas modalidades, una molécula biespecífica comprende más de dos sitios de unión al epítipo. Tales moléculas biespecíficas se unirán al menos a un epítipo de PD-1 y al menos un epítipo de CTLA-4 y puede unirse aún más a epítopos adicionales de PD-1 y/o epítopos adicionales de CTLA-4.

10 **[00101]** La presente invención en particular se relaciona con moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos biespecíficos, moléculas de unión trivalente, etc.) que poseen fragmentos de unión al epítipo de anticuerpos que les permiten ser capaces de unirse de forma coordinada al menos a un epítipo de PD-1 y al menos a un epítipo de CTLA-4. La selección de los Dominios de VL y VH de los dominios del polipéptido de tales moléculas se coordina de modo que el Dominio de VL y el Dominio de VH de la misma cadena de polipéptidos no sea capaz de formar un sitio de unión al epítipo capaz de unirse ya sea a PD-1 o CTLA-4. Tal selección se coordina de forma adicional de modo que las cadenas de polipéptidos que conforman tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 se ensamblen para formar al menos un sitio funcional de unión al antígeno que sea específico por al menos un epítipo de PD-1 y al menos un sitio funcional de unión al

antígeno que sea específico por al menos un epítipo de CTLA-4.

**[00102]** La presente invención se relaciona en particular con tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que muestran una actividad que se intensifica en relación con tal actividad

5 de dos moléculas monoespecíficas, una de las cuales posee el Dominio Variable de Cadena Pesada y el Dominio Variable de Cadena Ligera del anticuerpo que une PD-1 y la otra de las cuales posee el Dominio Variable de Cadena Pesada y el Dominio Variable de Cadena Ligera del anticuerpo que une CTLA-4.

10 Ejemplos de tal actividad incluyen atenuar la actividad de PD-1, atenuar la actividad de CTLA-4, intensificar la activación del sistema inmune, intensificar la función efectora, intensificar la actividad anti-tumor. Como se utiliza en la presente, tal atenuación de actividad se refiere a una

15 reducción de 10% o más, una reducción de 20% o más, una reducción de 50% o más, una reducción de 80% o más, o una reducción de 90% o más en una actividad de inhibición de PD-1 y/o CTLA-4, o la eliminación completa de tal actividad de inhibición de PD-1 y/o CTLA-4. Como se utiliza en la presente,

20 tal intensificación de actividad se refiere a una intensificación de 10% o más, una intensificación de 20% o más, una intensificación de 50% o más, una intensificación de 80% o más, o una intensificación de 90% o más en una actividad de activación del sistema inmune mediada por o afectada por la

25 expresión o presencia de PD-1 y/o CTLA-4, en relación con la

actividad mostrada por dos moléculas monoespecíficas, una de las cuales posee el Dominio Variable de Cadena Pesada y el Dominio Variable de Cadena Ligera del anticuerpo que une PD-1 y la otra de las cuales posee el Dominio Variable de Cadena Pesada y el Dominio Variable de Cadena Ligera del anticuerpo que une CTLA-4. Ejemplos de actividades que activan el sistema inmune incluyen, pero no se limitan a células inmunes (*por ejemplo*, linfocitos T, células NK) proliferación, producción y/o liberación de células inmunes de citocinas, producción y/o liberación de células inmunes de moléculas líticas (*por ejemplo*, granzima, perforina, *etc.*), y/o expresión de células inmunes de marcadores de activación. Las citocinas que se liberan después de la activación del sistema inmune se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a: IFN $\gamma$ , IL-2, y TNF $\alpha$ , (véase, *por ejemplo*, Janeway, C.A. *et al.* 2011) IMMUNOBIOLOGY" 8<sup>a</sup> ed. Garland Science Publishing, NY; Banyer, J.L. (2000) "*Cytokines in innate and adaptive immunity*", Rev Immunogenet. 2:359-373). Los marcadores de activación expresados por las células inmunes se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, CD69, CD25, y CD107a (véase, *por ejemplo*, Janeway, C.A. *et al.* (2011) IMMUNOBIOLOGY" 8<sup>a</sup> ed. Garland Science Publishing, NY; Shipkova, M. y Wieland, E. (2012) "*Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferaci3n*", Clin Chim Acta 413:1338-1349).

**A. Anticuerpos biespecíficos de PD-1 x CTLA-4**

[00103] La invención instantánea abarca anticuerpos biespecíficos capaces de unirse de forma simultánea a PD-1 y CTLA-4. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico  
5 capaz de unirse de forma simultánea a PD-1 y CTLA-4 se produce utilizando cualquiera de los métodos descritos en las Publicaciones PCT No. WO 1998/002463, WO 2005/070966, WO 2006/107786 WO 2007/024715, WO 2007/075270, WO 2006/107617, WO 2007/046893, WO 2007/146968, WO 2008/003103, WO 2008/003116,  
10 WO 2008/027236, WO 2008/024188, WO 2009/132876, WO 2009/018386, WO 2010/028797, WO2010028796, WO 2010/028795, WO 2010/108127, WO 2010/136172, WO 2011/086091, WO 2011/133886, WO 2012/009544, WO 2013/003652, WO 2013/070565, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2013/174873, y WO 2014/022540, cada una de las cuales se  
15 incorpora en la presente para referencia en su totalidad.

**B. Diacuerpos Biespecíficos de PD-1 x CTLA-4 que carecen de Regiones de Fc**

[00104] Una modalidad de la presente invención se relaciona  
20 con diacuerpos biespecíficos que comprenden, y de mayor preferencia se componen de, una primera cadena de polipéptidos y una segunda cadena de polipéptidos, cuyas secuencias permiten que las cadenas de polipéptidos se unan de forma covalente entre sí para formar un diacuerpo asociado de forma covalente  
25 que sea capaz de unirse de forma simultánea a PD-1 y a CTLA-4.

**[00105]** La primera cadena de polipéptidos de tal modalidad de diacuerpos biespecíficos comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, el Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a cualquiera de PD-1 o CTLA-4 (es  
 5 decir, ya sea VL<sub>PD-1</sub> o VL<sub>CTLA-4</sub>), un primer péptido separador de intervención (Enlazador 1), un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a cualquiera de CTLA-4 (si tal primera cadena de polipéptidos contiene VL<sub>PD-1</sub>) o PD-1 (si tal primera cadena de polipéptidos contiene VL<sub>CTLA-4</sub>), un segundo  
 10 péptido separador de intervención (Enlazador 2) que contiene opcionalmente un residuo de cisteína, un Dominio Promotor de Heterodímeros y un C-término (**Figura 1**).

**[00106]** La segunda cadena de polipéptidos de esta modalidad de diacuerpos biespecíficos comprende, en dirección N-terminal  
 15 a C-terminal, un N-término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a cualquiera de PD-1 o CTLA-4 (es decir, cualquiera de VL<sub>PD-1</sub> o VL<sub>CTLA-4</sub>, y ser el Dominio de VL no seleccionado para inclusión en la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo), un péptido separador de  
 20 intervención (Enlazador 1), un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a cualquiera de CTLA-4 (si tal segunda cadena de polipéptidos contiene VL<sub>PD-1</sub>) o un PD-1 (si tal segunda cadena de polipéptidos contiene VL<sub>CTLA-4</sub>), un segundo péptido separador de intervención (Enlazador 2) que contiene  
 25 opcionalmente un residuo de cisteína, un Dominio Promotor de

Heterodímeros, y un C-término (**Figura 1**).

**[00107]** El Dominio de VL de la primera cadena de polipéptidos interactúa con el Dominio de VH de la segunda cadena de polipéptidos para formar un primer sitio funcional de unión al  
 5 antígeno que es específico para un primer antígeno (*es decir*, cualquiera de PD-1 o CTLA-4). De forma similar, el Dominio de VL de la segunda cadena de polipéptidos interactúa con el Dominio de VH de la primera cadena de polipéptidos para formar un segundo sitio funcional de unión al antígeno que es  
 10 específico para un segundo antígeno (*es decir*, cualquiera de CTLA-4 o PD-1). De este modo, se coordina la selección de los Dominios de VL y VH de la primera y segunda cadenas de polipéptidos, de modo que las dos cadenas de polipéptidos del diacuerpo comprendan de forma colectiva los Dominios de VL y  
 15 VH capaces de unirse a ambos de un epítipo de PD-1 y a un epítipo de CTLA-4 (*es decir*, que comprendan de forma colectiva  $VL_{PD-1}/VH_{PD-1}$  y  $VL_{CTLA-4}/VH_{CTLA-4}$ ).

**[00108]** De mayor preferencia, la longitud del péptido enlazador de intervención (Enlazador 1, que separa tales  
 20 Dominios de VL y VH) se selecciona para prevenir de forma sustancial o completa que los Dominios de VL y VH de la cadena de polipéptidos se unan entre sí (por ejemplo, que consiste de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 residuos de aminoácidos enlazadores de intervención). De este modo, los Dominios de VL  
 25 y VH de la primera cadena de polipéptidos son de forma

sustancial o completa incapaces de unirse entre sí. De forma similar, los Dominios de VL y VH de la segunda cadena de polipéptidos son de forma sustancial o completa incapaces de unirse entre sí. Un péptido separador de intervención preferido

5 (Enlazador 1) tiene la secuencia (**SEQ ID NO:5**): GGGSGGGG.

[00109] La longitud y composición del segundo péptido separador de intervención (Enlazador 2) se selecciona con base en la elección de uno o más dominios de polipéptidos que promuevan tal dimerización (*es decir*, un "**Dominio Promotor de**  
 10 **Heterodímeros**"). Típicamente, el segundo péptido separador de intervención (Enlazador 2) comprenderá de 3-20 residuos de aminoácidos. En particular, cuando el Dominio Promotor de Heterodímeros(s) empleado comprende o no un residuo de cisteína, se utiliza un segundo péptido separador de  
 15 intervención (Enlazador 2) que contenga cisteína. Un segundo péptido separador de intervención (Enlazador 2) que contiene cisteína contendrá 1, 2, 3 o más cisteínas. Un péptido separador preferido (Enlazador 2) que contiene cisteína tiene la secuencia de **SEQ ID NO:6**: GGCGGG. Alternativamente, se  
 20 utiliza el Enlazador 2 que no comprende una cisteína (*por ejemplo*, GGG, GGGS (**SEQ ID NO:7**), LGGGSG (**SEQ ID NO:8**), GGGSGGGSGGG (**SEQ ID NO:9**), ASTKG (**SEQ ID NO:10**), LEPKSS (**SEQ ID NO:11**), APSSS (**SEQ ID NO:12**), *etc.*) y un Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene Cisteína, como se describe a  
 25 continuación. Opcionalmente, se utilizan tanto el Enlazador 2

que contiene cisteína como un Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína.

**[00110]** Los Dominios Promotores de Heterodímeros pueden ser GVEPKSC (**SEQ ID NO:13**) o VEPKSC (**SEQ ID NO:14**) o AEPKSC (**SEQ ID NO:15**) en una cadena de polipéptidos y GFNRGEC (**SEQ ID NO:16**) o FNRGEC (**SEQ ID NO:17**) en la otra cadena de polipéptidos (US2007/0004909).

**[00111]** En una modalidad preferida, los Dominios Promotores de Heterodímeros comprenderán dominios con hélices repetidas en tándem de carga opuesta, por ejemplo, los dominios helicoidales con "hélice E" (**SEQ ID NO:18: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**), cuyos residuos de glutamato formarán una carga negativa a pH 7, y los dominios con "hélice K" (**SEQ ID NO:19: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE**), cuyos residuos de lisina formarán una carga positiva a pH 7. La presencia de tales dominios cargados promueve la asociación entre el primer y segundo polipéptidos, y de este modo refuerza la formación de heterodímeros. Pueden utilizarse Dominios Promotores de Heterodímeros que comprenden las modificaciones de las secuencias de hélice E y hélice K descritas en lo anterior a modo de incluir uno o más residuos de cisteína. La presencia de tales residuos de cisteína permite a la hélice presente en una cadena de polipéptidos volverse enlazada de forma covalente en una hélice complementaria presente en otra cadena de polipéptidos, uniendo de forma covalente de este modo las

cadenas de polipéptidos entre sí e incrementando la estabilidad del diacuerpo. Ejemplos de tales que se prefieren en particular son los Dominios Promotores de Heterodímeros que incluyen una Hélice E Modificada que tiene la secuencia de aminoácidos

5 EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (SEQ ID NO:20), y una hélice K modificada que tiene la secuencia de aminoácidos KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE (SEQ ID NO:21).

[00112] Como se describe en WO 2012/018687, para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de los diacuerpos, puede

10 modificarse un diacuerpo para que contenga una porción de polipéptidos de una proteína de unión a suero en uno o más de los términos del diacuerpo. De mayor preferencia, se instalará tal porción de polipéptidos de una proteína de unión a suero en el C-término del diacuerpo. La albúmina es la proteína más

15 abundante en plasma y tiene una vida media de 19 días en humanos. La albúmina posee diversos sitios de unión de moléculas pequeñas que le permiten no unirse de forma covalente a otras proteínas y extender de este modo sus vidas medias en suero. El Dominio de Unión a la Albúmina 3 (ABD3) de la proteína

20 G de la cepa G148 de *Streptococcus* consiste de 46 residuos de aminoácidos que forman un haz de tres hélices estable y tiene una amplia especificidad de unión a la albúmina (Johansson, M.U. *et al.* (2002) "Structure, Specificity, and Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules", J. Biol.

25 Chem. 277(10):8114-8120. De este modo, una porción de

polipéptido preferida en particular de una proteína de unión a suero para mejorar las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de un diacuerpo es el Dominio de Unión a la Albúmina (ABD) de la proteína G estreptocócica, y de mayor preferencia, el Dominio  
 5 de Unión a la Albúmina 3 (ABD3) de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus* (**SEQ ID NO:22**): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

**[00113]** Como se describe en WO 2012/162068 (incorporado en la presente para referencia), las variantes "**desinmunizadas**"  
 10 de **SEQ ID NO:22** tienen la capacidad de atenuar o eliminar la unión de MHC clase II. Con base en los resultados de la mutación combinatorial, las siguientes combinaciones de sustituciones se consideran por ser las sustituciones preferidas para formar tal ABD desinmunizado: 66D/70S +71A; 66S/70S +71A; 66S/70S  
 15 +79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Las variantes de ABD tienen las modificaciones L64A, I65A y D79A o las modificaciones N66S, T70S y D79A. La variante de ABD desinmunizados tiene la secuencia de  
 20 aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLID<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> **A**<sub>71</sub>EGVKALIDE ILAALP  
 (**SEQ ID NO:23**),

o la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA<sub>64</sub>**A**<sub>65</sub>NNAKT VEGVKALIA<sub>79</sub>E ILAALP  
 25 (**SEQ ID NO:24**),

o la secuencia de aminoácidos:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> VEGVKALIAA<sub>79</sub>E ILAALP

(**SEQ ID NO:25**),

se prefieren en particular como tal el ABD desinmunizado que  
 5 muestra sustancialmente la unión de tipo silvestre mientras  
 que proporciona una unión atenuada de los MHC clase II. De  
 este modo, la primera cadena de polipéptidos de tal diacuerpo  
 que tiene un ABD contiene un tercer enlazador (Enlazador 3)  
 colocado de preferencia de forma C-terminal en el Dominio de  
 10 hélice E (o hélice K) de tal cadena de polipéptidos a modo de  
 intervenir entre el Dominio de hélice E (o hélice K) y el ABD  
 (el cual es de preferencia un ABD desinmunizado). Una secuencia  
 preferida de tal Enlazador 3 es **SEQ ID NO:7**: GGGS.

15      **C. Diacuerpos Biespecíficos de PD-1 x CTLA-4 que contienen  
                                          Regiones de Fc**

[00114] Una modalidad de la presente invención se relaciona  
 con diacuerpos biespecíficos capaces de unirse de forma  
 simultánea a un PD-1 y CTLA-4 que comprenden una Región de Fc.  
 20 La adición de un Dominio de CH2-CH3 de IgG a una o ambas cadenas  
 de polipéptidos del diacuerpo, de modo que el acomplejamiento  
 de las cadenas de diacuerpo resulta en la formación de una  
 Región de Fc, incrementa la vida media biológica y/o altera la  
 valencia del diacuerpo. Al incorporar los Dominios de CH2-CH3  
 25 de IgG sobre los polipéptidos del diacuerpo se permitirá un

diacuerpo biespecífico que contiene la Región de Fc de dos cadenas para formar (**Figura 2**).

[00115] Alternativamente, al incorporar Dominios de CH2-CH3 de IgG sobre únicamente uno de los polipéptidos del diacuerpo se permitirá un diacuerpo biespecífico que contiene la Región de Fc de cuatro cadenas más complejo para formar (**Figuras 3A-3C**). La **Figura 3C** muestra un diacuerpo de cuatro cadenas representativo que posee el Dominio Constante de Cadena Ligera (CL) y el Dominio Constante de Cadena Pesada CH1, sin embargo, pueden emplearse alternativamente fragmentos de tales dominios así como otros polipéptidos (véase, por ejemplo, las **Figuras 3A y 3B**, Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos Nos. 2013-0295121; 2010-0174053 y 2009-0060910; Publicación de Patente Europea No. EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 y Publicaciones PCT No. WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538). De este modo, por ejemplo, en vista del Dominio de CH1, uno puede emplear un péptido que tenga la secuencia de aminoácidos GVEPKSC (**SEQ ID NO:13**) VEPKSC (**SEQ ID NO:14**), o AEPKSC (**SEQ ID NO:15**), derivado de la Región de Bisagra de una IgG de humano, y en vista del Dominio de CL, uno puede emplear los 6 aminoácidos C-terminales de la Cadena Ligera kappa de humano, GFNRGEC (**SEQ ID NO:16**) o FNRGEC (**SEQ ID NO:17**). Un péptido representativo que contiene el diacuerpo de cuatro cadenas se representa en la **Figura 3A**. Alternativamente o además, uno puede emplear un péptido que

comprende dominios de hélice en tándem de carga opuesta tales como los dominios helicoidales con "hélice E" (**SEQ ID NO:18: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK** o **SEQ ID NO:19: EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK**); y los dominios con "hélice K" (**SEQ ID NO:20: KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK** o **SEQ ID NO:21: KVAACEK-KVAALEK-KVAALEK-KVAALEK**). Un diacuerpo de cuatro cadenas que contiene el dominio en hélice representativo se muestra en la **Figura 3B**.

**[00116]** Las moléculas biespecíficas que contienen la Región de Fc de la presente invención pueden incluir péptidos separadores de intervención adicionales (Enlazadores), generalmente tales Enlazadores se incorporarán entre un péptido del Dominio Promotor de Heterodímeros (*por ejemplo*, una hélice E o hélice K) y los Dominios de CH2-CH3 y/o entre los Dominios de CH2-CH3 y un Dominio Variable (*es decir*, VH o VL). Típicamente, los Enlazadores adicionales comprenderán de 3-20 residuos de aminoácidos. Los Enlazadores que pueden emplearse en las moléculas de diacuerpo biespecífico que contienen la Región de Fc de la presente invención incluyen: GGGs (**SEQ ID NO:7**), LGGSG (**SEQ ID NO:8**), GGGSGGGSGG (**SEQ ID NO:9**), ASTKG (**SEQ ID NO:10**), DKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:26**), EPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:27**), LEPKSS (**SEQ ID NO:11**), APSSS (**SEQ ID NO:28**), y APSSSPME (**SEQ ID NO:29**), LEPKSADKTHTCPPC (**SEQ ID NO:30**), GGC, y GGG. **SEQ ID NO:11** pueden utilizarse en vista de GGG o GGC para facilidad de clonación. Adicionalmente, los aminoácidos GGG, o

**SEQ ID NO:11** pueden seguirse inmediatamente por **SEQ ID NO:26** para formar los enlazadores alternos: GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**); y LEPKSSDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:32**). Las moléculas biespecíficas que contienen la Región de Fc de la presente  
 5 invención pueden incorporar una Región de Bisagra de IgG además de o en lugar de un enlazador. Las Regiones de Bisagra ejemplares incluyen: EPKSCDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:33**) de IgG1, ERKCCVECPPCP (**SEQ ID NO:34**) de IgG2, ESKYGPPCPSCP (**SEQ ID NO:35**) de IgG4, y ESKYGPPCPPCP (**SEQ ID NO:36**) una variante de  
 10 bisagra de IgG4 que comprende una sustitución S228P de estabilización (como se numera por el índice EU como se establece en Kabat) para reducir el intercambio de hebras.

**[00117]** Como se proporciona en las **Figuras 3A-3C**, los diacuerpos biespecíficos que contienen la Región de Fc de la  
 15 invención pueden comprender cuatro cadenas diferentes. La primera y tercera cadenas de polipéptidos de tal diacuerpo contienen tres dominios: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VL2, (iii) un Dominio Promotor de Heterodímeros y (iv) un Dominio que contiene una secuencia de  
 20 CH2-CH3. La segunda y cuarta cadenas de polipéptidos contienen: (i) un Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1 y (iii) un Dominio Promotor de Heterodímeros, donde los Dominios Promotores de Heterodímeros promueven la dimerización de la primera/tercera cadenas de polipéptidos con la  
 25 segunda/cuarta cadenas de polipéptidos. Los Dominios de VL y/o

VH de la tercera y cuarta cadenas de polipéptidos, y los Dominios de VL y/o VH de la primera y segunda cadenas de polipéptidos pueden ser los mismos o diferentes a manera de permitir la unión tetravalente que es cualquiera de

5 monoespecífica, biespecífica o tetraespecífica. Las notaciones "VL3" y "VH3" denotan, respectivamente, el Dominio Variable de Cadena Ligera y el Dominio Variable de Cadena Pesada que se unen a un "tercer" epítipo de tal diacuerpo. De forma similar, las notaciones "VL4" y "VH4" denotan respectivamente, el

10 Dominio Variable de Cadena Ligera y el Dominio Variable de Cadena Pesada que se unen a un "cuarto" epítipo de tal diacuerpo. La estructura general de las cadenas de polipéptidos de los diacuerpos biespecíficos que contienen la Región de Fc representativa de cuatro cadenas de la invención se proporciona

15 en la **Tabla 1**:

| <b>Tabla 1</b>  |                       |                                           |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------------------|
| Biespecífica    | 2 <sup>a</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
|                 | 1 <sup>a</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                 | 1 <sup>a</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                 | 2 <sup>a</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
| Tetraespecífica | 2 <sup>a</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
|                 | 1 <sup>a</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                 | 3 <sup>a</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL3-VH4-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                 | 4 <sup>a</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL4-VH3-HPD-COOH         |

HPD = Dominio Promotor de Heterodímeros

[00118] En una modalidad específica, los diacuerpos de la presente invención son biespecíficos, tetravalentes (*es decir*, poseen cuatro sitios de unión al epítopo), los diacuerpos que contienen Fc se componen de cuatro cadenas de polipéptidos en total (**Figuras 3A-3C**). Los diacuerpos biespecíficos tetravalentes que contienen Fc de la invención comprenden dos sitios de unión al epítopo inmuno-específico para PD-1 (los cuales pueden ser capaces de unirse al mismo epítopo de PD-1 o a epítopos diferentes de PD-1), y dos sitios de unión al epítopo inmuno-específico para CTLA-4 (los cuales pueden ser capaces de unirse al mismo epítopo de CTLA-4 o a epítopos diferentes de CTLA-4).

[00119] En una modalidad adicional, los diacuerpos biespecíficos que contienen la Región de Fc pueden comprender tres cadenas de polipéptidos. El primer polipéptido de tal diacuerpo contiene tres dominios: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia de CH2-CH3. El segundo polipéptido de tal diacuerpo contiene: (i) un Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1 y (iii) un Dominio que promueve la heterodimerización y unión covalente con la primera cadena de polipéptidos del diacuerpo. El tercer polipéptido de tal diacuerpo comprende una secuencia de CH2-CH3. De este modo, la primera y segunda cadenas de polipéptidos de tal diacuerpo se asocian juntas para formar un sitio de unión de VL1/VH1 que es

capaz de unirse al primer epítipo (es decir, cualquiera de PD-1 o CTLA-4), así como un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse al segundo epítipo (es decir, cualquiera de CTLA-4 o PD-1). El primer y segundo polipéptidos se unen entre sí a través de un enlace disulfuro que implica residuos de cisteína en sus Terceros Dominios respectivos. De forma notable, el complejo de primera y tercera cadenas de polipéptidos con otro para formar una Región de Fc se estabiliza mediante un enlace disulfuro. Tales diacuerpos biespecíficos tienen potencia intensificada. Las **Figuras 4A y 4B** ilustran las estructuras de tales diacuerpos. Tales diacuerpos biespecíficos que contienen la Región Fc pueden tener cualquiera de las dos orientaciones (**Tabla 2**):

| Tabla 2             |           |                                                                     |
|---------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------|
| Primera Orientación | 3a Cadena | NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH             |
|                     | 1a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH |
|                     | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH                                   |
| Segunda Orientación | 3a Cadena | NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -COOH             |
|                     | 1a Cadena | NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> -VL1-VH2-HPD-COOH |
|                     | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH                                   |

HPD = Dominio Promotor de Heterodímeros

**[00120]** En una modalidad específica, los diacuerpos de la presente invención son biespecíficos, bivalentes (es decir, poseen dos sitios de unión al epítipo), diacuerpos que contienen Fc que se componen de tres cadenas de polipéptidos

en total (**Figuras 4A-4B**). Los diacuerpos biespecíficos bivalentes que contienen Fc de la invención comprenden un sitio de unión al epítipo inmuno-específico para PD-1, y un sitio de unión al epítipo específico para CTLA-4.

5    **[00121]**    En una modalidad adicional, los diacuerpos biespecíficos que contienen la Región de Fc pueden comprender un total de cinco cadenas de polipéptidos. En una modalidad particular, dos de las cinco cadenas de polipéptidos tienen la misma secuencia de aminoácidos. La primera cadena de  
10    polipéptidos de tal diacuerpo contiene: (i) un Dominio que contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1, y (iii) un Dominio que contiene una secuencia de CH2-CH3. La primera cadena de polipéptidos puede ser la cadena pesada de un anticuerpo que contiene un VH1 y una región constante de cadena  
15    pesada. La segunda y quinta cadenas de polipéptidos de tal diacuerpo contienen: (i) un Dominio que contiene VL1, y (ii) un dominio que contiene CL. La segunda y/o quinta cadenas de polipéptidos de tal diacuerpo pueden ser cadenas ligeras de un anticuerpo que contiene una VL1 complementaria a la VH1 de la  
20    primera/tercera cadena de polipéptidos. La primera, segunda y/o quinta cadenas de polipéptidos pueden aislarse a partir de un anticuerpo de origen natural. Alternativamente, pueden construirse de forma recombinante. La tercera cadena de polipéptidos de tal diacuerpo contiene: (i) un Dominio que  
25    contiene VH1, (ii) un dominio que contiene CH1, (iii) un

Dominio que contiene una secuencia de CH2-CH3, (iv) un Dominio que contiene VL2, (v) un Dominio que contiene VH3 y (vi) un Dominio Promotor de Heterodímeros, donde los Dominios Promotores de Heterodímeros promueven la dimerización de la  
 5 tercera cadena con la cuarta cadena. El cuarto polipéptido de tales diacuerpos contiene: (i) un Dominio que contiene VL3, (ii) un Dominio que contiene VH2 y (iii) un Dominio que promueve la heterodimerización y unión covalente con la tercera cadena de polipéptidos del diacuerpo.

10 **[00122]** De este modo, la primera y segunda y la tercera y quinta cadenas de polipéptidos de tales diacuerpos se asocian juntas para formar dos sitios de unión de VL1/VH1 capaces de unirse al primer epítipo. La tercera y cuarta cadenas de polipéptidos de tales diacuerpos se asocian juntas para formar  
 15 un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse a un segundo epítipo, así como un sitio de unión de VL3/VH3 que es capaz de unirse a un tercer epítipo. El primer y tercer polipéptidos se unen entre sí a través de un enlace disulfuro que implican residuos de cisteína en sus regiones constantes respectivas. De  
 20 forma notable, el complejo de la primera y tercera cadenas de polipéptidos entre sí forma una Región de Fc. Tales diacuerpos biespecíficos tienen potencia intensificada. La **Figura 5** ilustra la estructura de tales diacuerpos. Se entenderá que los Dominios de VL1/VH1, VL2/VH2, y VL3/VH3 pueden ser los  
 25 mismos o diferentes a modo de permitir la unión que es

monoespecífica, biespecífica o triespecífica. Sin embargo, como se proporciona en la presente, estos dominios se seleccionan de preferencia a modo de unirse a PD-1 y CTLA-4.

**[00123]** Los Dominios de VL y VH de las cadenas de polipéptidos se seleccionan a modo de formar sitios de unión a VL/VH específicos para un epítipo deseado. Los sitios de unión a VL/VH formados por la asociación de las cadenas de polipéptidos pueden ser los mismos o diferentes a modo de permitir la unión tetravalente que es monoespecífica, biespecífica, triespecífica o tetraespecífica. En particular, los Dominios de VL y VH pueden seleccionarse de modo que un diacuerpo biespecífico pueda comprender dos sitios de unión para un primer epítipo y dos sitios de unión para un segundo epítipo, o tres sitios de unión para un primer epítipo y un sitio de unión para un segundo epítipo, o dos sitios de unión para un primer epítipo, un sitio de unión para un segundo epítipo y un sitio de unión para un tercer epítipo (como se representa en la **Figura 5**). La estructura general de las cadenas de polipéptidos de los diacuerpos que contienen la Región de Fc de cinco cadenas representativas de la invención se proporciona en la **Tabla 3**:

| <b>Tabla 3</b>        |           |                                       |
|-----------------------|-----------|---------------------------------------|
| Biespecífica<br>(2x2) | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH          |
|                       | 1a Cadena | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH |

| <b>Tabla 3</b>           |                        |                                                   |
|--------------------------|------------------------|---------------------------------------------------|
|                          | 3a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH2-HPD-COOH |
|                          | 5 <sup>nd</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                          | 4a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VL2-VH2-HPD-COOH                 |
| Biespecífica<br>(3x1)    | 2a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                          | 1a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH             |
|                          | 3a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH |
|                          | 5 <sup>nd</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                          | 4a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH                 |
| Triespecífica<br>(2x1x1) | 2a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                          | 1a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-COOH             |
|                          | 3a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VH1-CH1-CH2-CH3-VL2-VH3-HPD-COOH |
|                          | 5 <sup>nd</sup> Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-CL-COOH                      |
|                          | 4a Cadena              | NH <sub>2</sub> -VL3-VH2-HPD-COOH                 |

HPD = Dominio Promotor de Heterodímeros

**[00124]** En una modalidad específica, los diacuerpos de la presente invención son diacuerpos biespecíficos tetravalentes que contienen Fc (es decir, que poseen cuatro sitios de unión al epítipo), que se componen de cinco cadenas de polipéptidos en total tienen dos sitios inmuno-específicos de unión al epítipo para PD-1 (el cual puede ser capaz de unirse al mismo epítipo de PD-1 o a epítopos diferentes de PD-1), y dos sitios

de unión al epítopo específica para CTLA-4 (la cual puede ser capaz de unirse al mismo epítopo de CTLA-4 o a epítopos diferentes de CTLA-4). En otra modalidad, los diacuerpos biespecíficos tetravalentes que contienen Fc de la invención  
 5 comprenden tres sitios de unión al epítopo inmuno-específico para PD-1 (los cuales pueden ser capaces de unirse al mismo epítopo de PD-1 o a dos o tres epítopos diferentes de PD-1), y un sitio de unión al epítopo específico para CTLA-4. En otra modalidad, los diacuerpos biespecíficos tetravalentes que  
 10 contienen Fc de la invención comprenden un sitio de unión al epítopo inmuno-específico para PD-1, y tres sitios de unión al epítopo específicos para CTLA-4 (el cual pueden ser capaces de unirse al mismo epítopo de CTLA-4 o a dos o tres epítopos diferentes de CTLA-4).

15

#### **D. Moléculas Biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de Unión**

##### **Trivalente que contienen Regiones de Fc**

**[00125]** Una modalidad adicional de la presente invención se relaciona con moléculas biespecíficas de unión trivalente que  
 20 comprenden una Región de Fc capaz de unirse de forma simultánea a un epítopo de PD-1 y un epítopo presente en CTLA-4. Tales moléculas biespecíficas de unión trivalente comprenden tres sitios de unión al epítopo, dos de las cuales son Dominios de Unión de Tipo Diacuerpo, que proporcionan la unión al Sitio A  
 25 y la unión al Sitio B, y una de las cuales es un dominio de

unión tipo Fab (o un dominio de unión tipo scFv), el cual proporciona la unión al Sitio C (véase, *por ejemplo*, **Figuras 6A-6F**, y Solicitud de PCT No: PCT/US15/33081; y PCT/US15/33076). Tales moléculas trivalentes biespecíficas

5 comprenden de este modo los dominios de "VL1"/"VH1" que son capaces de unirse al primer epítipo y los dominios de "VL2"/"VH2" que son capaces de unirse al segundo epítipo y los dominios de "VL3" y "VH3" que son capaces de unirse al "tercer" epítipo de tal molécula trivalente. Un "Dominio de Unión Tipo

10 Diacuerpo" es el tipo de sitio de unión al epítipo presente en un diacuerpo, y especialmente, un diacuerpo DART®, como se describe en lo anterior. Cada uno de un "Dominio de Unión Tipo Fab" y un "Dominio de Unión Tipo scFv" son sitios de unión al epítipo que se forman por la interacción del Dominio de VL de

15 una cadena ligera de inmunoglobulina y un Dominio de VH de complementariedad de una cadena pesada de inmunoglobulina. Los Dominios de Unión Tipo Fab difieren de los Dominios de unión de Tipo Diacuerpo en que las dos cadenas de polipéptidos que forman un dominio de unión tipo Fab comprenden únicamente un

20 solo sitio de unión al epítipo, mientras que las dos cadenas de polipéptidos que forman un Dominio de Unión Tipo Diacuerpo comprenden al menos dos sitios de unión al epítipo. De forma similar, los Dominios de Unión Tipo scFv también difieren de los Dominios de Unión de Tipo Diacuerpo que comprenden

25 únicamente un solo sitio de unión al epítipo. De este modo,

como se utiliza en la presente los Dominios de Unión Tipo Fab y Tipo scFv son distintos de los Dominios de Unión de Tipo Diacuerpo.

[00126] Típicamente, las moléculas de unión trivalente de la presente invención comprenderán cuatro cadenas de polipéptidos diferentes (véase **Figuras 6A-6B**), sin embargo, las moléculas pueden comprender números menores o mayores de cadenas de polipéptidos, por ejemplo al fusionar tales cadenas de polipéptidos entre sí (*por ejemplo*, mediante un enlace peptídico) o al dividir tales cadenas de polipéptidos para formar cadenas de polipéptidos adicionales, o al asociar menos cadenas de polipéptidos o adicionales mediante enlaces disulfuro. Las **Figuras 6C-6F** ilustran este aspecto de la presente invención al representar de forma esquemática tales moléculas que tienen tres cadenas de polipéptidos. Como se proporciona en las **Figuras 6A-6F**, las moléculas de unión trivalente de la presente invención pueden tener orientaciones alternativas en las cuales los dominios de unión de tipo diacuerpo son N-terminales (**Figuras 6A, 6C y 6D**) o C-terminales (**Figuras 6B, 6E y 6F**) en una Región de Fc.

[00127] En ciertas modalidades, la primera cadena de polipéptidos de tales moléculas de unión trivalente de la presente invención contiene: (i) un Dominio que contiene VL1, (ii) un Dominio que contiene VH2, (iii) un Dominio Promotor de Heterodímeros, y (iv) un Dominio que contiene una secuencia de

CH2-CH3. Los Dominios de VL1 y VL2 se ubican N-terminales o C-terminales en el dominio que contiene CH2-CH3 como se presenta en la **Tabla 4** (también véase, **Figuras 6A y 6B**). La segunda cadena de polipéptidos de tales modalidades contiene: (i) un

5 Dominio que contiene VL2, (ii) un Dominio que contiene VH1, y (iii) un Dominio Promotor de Heterodímeros. La tercera cadena de polipéptidos de tales modalidades contiene: (i) un Dominio que contiene VH3, (ii) un dominio que contiene CH1 y (iii) un Dominio que contiene una secuencia de CH2-CH3. La tercera

10 cadena de polipéptidos puede ser la cadena pesada de un anticuerpo que contiene una VH3 y una región constante de cadena pesada, o un polipéptido que contiene tales dominios. El cuarto polipéptido de tales modalidades contiene: (i) un Dominio que contiene VL3 y (ii) un dominio que contiene CL.

15 Las cuatro cadenas de polipéptidos pueden ser una cadena Ligera de un anticuerpo que contiene un VL3 de complementariedad para la VH3 de la tercera cadena de polipéptidos, o un polipéptido que contiene tales dominios. La tercera o cuarta cadenas de polipéptidos puede aislarse de los anticuerpos de origen

20 natural. Alternativamente, pueden reconstruirse de forma recombinante, sintética o por otros medios.

**[00128]** El Dominio Variable de Cadena Ligera de la primera y segunda cadenas de polipéptidos se separan de los Dominios Variables de Cadena Pesada de tales cadenas de polipéptidos

25 por un péptido separador de intervención que tiene una longitud

que es muy corta para permitir que sus dominios de VL1/VH2 (o de VL2/VH1) se asocien juntos para formar el sitio de unión al epítipo capaz de unirse a cualquiera del primer o segundo epítipo. Un péptido separador de intervención preferido

5 (Enlazador 1) para este propósito tiene la secuencia (**SEQ ID NO: 9**): GGGSGGGG. Otros Dominios de moléculas de unión trivalente pueden separarse por uno o más péptidos separadores de intervención (Enlazadores), que comprenden opcionalmente un residuo de cisteína. En particular, como se proporciona en lo

10 anterior, tales Enlazadores se incorporarán típicamente entre los Dominios Variables (*es decir*, de VH o VL) y los péptidos de los Dominios Promotores de Heterodímeros (*por ejemplo*, una hélice E o hélice K) y entre tales péptidos de los Dominios Promotores de Heterodímeros (*por ejemplo*, una hélice E o hélice

15 K) y los Dominios de CH2-CH3. Los enlazadores ejemplares útiles para la generación de las moléculas de unión trivalente se proporcionan en lo anterior y también se proporcionan en las Solicitudes de PCT Nos: PCT/US15/33081; y PCT/US15/33076. De este modo, la primera y segunda cadenas de polipéptidos de

20 tales moléculas de unión trivalente se asocian juntas para formar un sitio de unión de VL1/VH1 capaz de unirse al primer epítipo, así como un sitio de unión de VL2/VH2 que es capaz de unirse a un segundo epítipo. La tercera y cuarta cadenas de polipéptidos de tales moléculas de unión trivalente se asocian

25 juntas para formar un sitio de unión de VL3/VH3 que es capaz

de unirse a un tercer epítopo.

**[00129]** Como se describe en lo anterior, las moléculas de unión trivalente de la presente invención pueden comprender tres polipéptidos. Las moléculas de unión trivalente que  
5 comprenden tres cadenas de polipéptidos pueden obtenerse al enlazar los dominios del cuarto polipéptido N-terminal en el Dominio que contiene VH3 del tercer polipéptido (*por ejemplo,* utilizando un péptido separador de intervención (**Enlazador 4**)). Alternativamente, se utiliza una tercera cadena de polipéptidos  
10 de una molécula de unión trivalente de la invención que contiene los dominios siguientes: (i) un Dominio que contiene VL3, (ii) un Dominio que contiene VH3, y (iii) un Dominio que contiene una secuencia de CH2-CH3, en donde las VL3 y VH3 se separan entre sí por un péptido separador de intervención que  
15 es lo suficientemente largo (al menos de 9 o más residuos de aminoácidos) a modo de permitir la asociación de estos dominios para formar un sitio de unión al epítopo. Un péptido separador de intervención preferido para este propósito tiene la secuencia: GGGSGGGSGGGGS (**SEQ ID NO:37**).

20 **[00130]** Se entenderá que los Dominios de VL1/VH1, VL2/VH2, y VL3/VH3 de tales moléculas de unión trivalente pueden ser diferentes a modo de permitir la unión que es biespecífica o triespecífica. Sin embargo, como se proporciona en la presente, estos dominios se seleccionan a modo de proporcionar una  
25 molécula de unión trivalente capaz de unirse a PD-1 y CTLA-4.

**[00131]** En particular, los Dominios de VL y VH pueden seleccionarse de modo que una molécula de unión trivalente comprende dos sitios de unión para PD-1 (la cual puede ser capaz de unirse al mismo epítipo de PD-1 o a epítopos diferentes de PD-1) y un sitio de unión para CTLA-4, o un sitio de unión para PD-1 y dos sitios de unión para CTLA-4 (el cual puede ser capaz de unirse al mismo epítipo de CTLA-4 o en epítopos diferentes de CTLA-4), o un sitio de unión para PD-1, un sitio de unión para CTLA-4 y un sitio de unión para un antígeno que no es PD-1 o CTLA-4. La estructura general de las cadenas de polipéptidos de las moléculas de unión trivalente representativas de la invención se proporciona en las **Figuras 6A-6F** y en la **Tabla 4**:

| <b>Tabla 4</b>                                               |           |                                           |
|--------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------|
| 1 <sup>a</sup><br>Orientación<br>de las<br>Cuatro<br>Cadenas | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
|                                                              | 1a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                                                              | 3a Cadena | NH <sub>2</sub> -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH     |
|                                                              | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL3-CL-COOH              |
| 2 <sup>a</sup><br>Orientación<br>de las<br>Cuatro<br>Cadenas | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
|                                                              | 1a Cadena | NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH |
|                                                              | 3a Cadena | NH <sub>2</sub> -VH3-CH1-CH2-CH3-COOH     |
|                                                              | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL3-CL-COOH              |
| 1 <sup>a</sup><br>Orientación<br>de las Tres<br>Cadenas      | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
|                                                              | 1a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL1-VH2-HPD-CH2-CH3-COOH |
|                                                              | 3a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH |
| 2 <sup>a</sup><br>Orientación<br>de las Tres                 | 2a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL2-VH1-HPD-COOH         |
|                                                              | 1a Cadena | NH <sub>2</sub> -CH2-CH3-VL1-VH2-HPD-COOH |

| Tabla 4 |           |                                           |
|---------|-----------|-------------------------------------------|
| Cadenas | 3a Cadena | NH <sub>2</sub> -VL3-VH3-HPD-CH2-CH3-COOH |

HPD = Dominio Promotor de Heterodímeros

[00132] Una modalidad de la presente invención se relaciona con moléculas biespecíficas de unión trivalente que comprenden dos sitios de unión al epítipo para PD-1 y un sitio de unión  
5 al epítipo para CTLA-4.

[00133] Los dos sitios de unión al epítipo para PD-1 pueden unirse al mismo epítipo o epítipos diferentes. Otra modalidad de la presente invención se relaciona con moléculas biespecíficas de unión trivalente que comprenden un sitio de  
10 unión al epítipo para PD-1 y dos sitios de unión al epítipo para CTLA-4. Los dos sitios de unión al epítipo para CTLA-4 pueden unirse al mismo epítipo o epítipos diferentes de CTLA-4. Como se proporciona en lo anterior, tales moléculas biespecíficas de unión trivalente pueden comprender tres,  
15 cuatro, cinco o más cadenas de polipéptidos.

#### V. Dominios Constantes y Regiones de Fc

[00134] Se proporcionan en la presente los Dominios Constantes de anticuerpo útiles en la generación de las  
20 moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 (*por ejemplo, anticuerpos, diacuerpos, moléculas de unión trivalente, etc.*) de la invención.

[00135] Un Dominio de CL preferido es un Dominio Kappa de CL de IgG de humano. La secuencia de aminoácidos de un Dominio

Kappa de CL de IgG de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:38**):

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG  
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLISKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK  
SFNRGEC

5 **[00136]** Alternativamente, un Dominio de CL ejemplar es un Dominio Lambda de CL de IgG de humano. La secuencia de aminoácidos de Dominio Lambda de CL de IgG de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:39**):

QPKAAPSVTL FPPSVÉASELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA  
10 GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP  
TECS

**[00137]** Como se proporciona en la presente, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención pueden comprender una Región de Fc. La Región de Fc de tales moléculas  
15 de la invención puede ser de cualquier isotipo (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4). Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención además pueden comprender un Dominio de CH1 y/o una Región de Bisagra. Cuando se encuentra presente, el Dominio de CH1 y/o Región de Bisagra puede ser de cualquier  
20 isotipo (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4), y es de preferencia del mismo isotipo como la Región de Fc deseada.

**[00138]** Un Dominio de CH1 ejemplar es un Dominio de CH de IgG1 de humano. La secuencia de aminoácidos de un Dominio de CH1 de IgG1 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:40**):

25 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV

**[00139]** Un Dominio de CH1 ejemplar es un Dominio de CH de IgG2 humano. La secuencia de aminoácidos de un Dominio de CH1 de IgG2 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:41**):

5 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTV

**[00140]** Un Dominio de CH1 ejemplar es un Dominio de CH1 de IgG4 de humano. La secuencia de aminoácidos de un Dominio de CH1 de IgG4 de humano es (**SEQ ID NO:42**):

10 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV

HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

**[00141]** Una Región de Bisagra ejemplar es una Región de Bisagra de IgG1 de humano. La secuencia de aminoácidos de una Región de Bisagra de IgG1 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:33**):

15 EPKSCDKTHTCPPCP.

**[00142]** Otra Región de Bisagra ejemplar es una Región de Bisagra de IgG2 de humano. La secuencia de aminoácidos de una Región de Bisagra de IgG2 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:34**):  
ERKCCVECPPCP.

20 **[00143]** Otra Región de Bisagra ejemplar es una Región de Bisagra de IgG4 de humano. La secuencia de aminoácidos de una Región de Bisagra de IgG4 de humano ejemplar es (**SEQ ID NO:35**):  
ESKYGPPCPSCP. Como se describe en la presente, una Región de Bisagra de IgG4 puede comprender una mutación de estabilización  
25 tal como la sustitución S228P. La secuencia de aminoácidos de

una Región de Bisagra de IgG4 estabilizada ejemplar es (**SEQ ID NO:36**): ESKYGPPCPPCP.

**[00144]** La Región de Fc de las moléculas que contienen la Región de Fc (*por ejemplo*, anticuerpos, diacuerpos, moléculas 5 trivalentes, *etc.*) de la presente invención pueden ser cualquiera de una Región de Fc completa (*por ejemplo*, una Región de Fc de IgG completa) o únicamente un fragmento de una Región de Fc. Opcionalmente, la Región de Fc de las moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención carecen 10 del residuo de aminoácidos de lisina C-terminal.

**[00145]** En la fracción inmune tradicional, la interacción de complejos de anticuerpos-antígeno con células del sistema inmune que resulta en una amplia disposición de respuestas, que oscila desde las funciones efectoras tales como la 15 citotoxicidad dependiente del anticuerpo, desgranulación de mastocitos, y fagocitosis para señales inmunomoduladoras tales como regular la proliferación de linfocitos y secreción de anticuerpos. Todas estas interacciones se inician a través de la unión de las Regiones de Fc de anticuerpo o complejos inmunes 20 en los receptores de superficie de la célula especializada en células hematopoyéticas. La diversidad de respuestas celulares accionadas por los anticuerpos y complejos inmunes resulta de la heterogeneidad estructural de los tres receptores de Fc: se activan los receptores FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) y FcγRIII (CD16) (es 25

decir, intensifican el sistema inmune); FcγRIIB (CD32B) es un receptor de inhibición (es decir, amortiguan el sistema inmune). Además, la interacción con el Receptor de Fc neonatal (FcRn) media el reciclado de las moléculas de IgG desde el endosoma en la superficie celular y se libera en la sangre. Las secuencias de aminoácidos de IgG1 de tipo silvestre (**SEQ ID NO:1**), IgG2 (**SEQ ID NO:2**), IgG3 (**SEQ ID NO:3**), e IgG4 (**SEQ ID NO:4**) ejemplares se presentan en lo anterior.

**[00146]** La modificación de la Región de Fc puede llevar a un fenotipo alterado, por ejemplo vida media en suero alterado, estabilidad alterada, susceptibilidad alterada en enzimas celulares o función efectora alterada. Por lo tanto, puede ser deseable modificar una molécula biespecífica que contiene una Región de Fc de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, a modo de intensificar la efectividad de tal molécula en tratar cáncer. La reducción o eliminación de la función efectora es deseable en ciertos casos, por ejemplo, en el caso de anticuerpos cuyo mecanismo de acción implica el bloqueo o antagonismo, pero no el exterminio de las células que portan un antígeno objetivo. La función efectora incrementada generalmente se desea cuando se dirige a células indeseadas, tal como células de tumor y extrañas, donde los FcγR se expresan a bajos niveles, por ejemplo, células B específicas de tumor con bajos niveles de FcγRIIB (por ejemplo, linfoma de no Hodgkin, CLL, y linfoma de

Burkitt). Las moléculas de la invención que poseen tal actividad de función efectora conferida o alterada son útiles en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad, trastorno o infección en la cual se desea una actividad de función efectora de eficacia intensificada.

**[00147]** En consecuencia, en ciertas modalidades, la Región de Fc de las moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención pueden ser una Región de Fc variante diseñada. Aunque la Región de Fc de las moléculas biespecíficas que contienen la Región de Fc de la presente invención puede poseer la capacidad de unirse a uno o más receptores de Fc (*por ejemplo*, FcγR), de mayor preferencia tal Región de Fc variante tienen una unión alterada a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión mostrada por una Región de Fc de tipo silvestre), *por ejemplo*, tendrán una unión intensificada para un receptor de activación y/o tendrán o no la capacidad sustancialmente reducida para unirse a receptores de inhibición. De este modo, la Región de Fc de las moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención puede incluir alguno o todos del Dominio de CH2 y/o alguno o todos del Dominio de CH3 de una Región de Fc completa, o puede comprender una secuencia de CH2 variante y/o una secuencia de CH3 variante (que puede incluir, *por ejemplo*, una o más inserciones y/o una o más supresiones con respecto a los

dominios de CH2 o CH3 de una Región de Fc completa). Tales Regiones de Fc pueden comprender porciones de polipéptidos sin Fc, o pueden comprender porciones de Regiones de Fc completas no naturales, o pueden comprender orientaciones de Dominios de CH2 y/o CH3 que no son de origen natural (tales como, por ejemplo, dos dominios de CH2 o dos dominios de CH3, o en dirección N-terminal a C-terminal, un Dominio de CH3 enlazado a un Dominio de CH2, etc.).

**[00148]** Las modificaciones de la Región de Fc identificadas como la función efectora alterada se conocen en la técnica, incluyendo modificaciones que incrementan la unión a receptores de activación (*por ejemplo*, FcγRIIA (CD16A) y reducen la unión de los receptores de inhibición (*por ejemplo*, FcγRIIB (CD32B) (véase, *por ejemplo*, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro and Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fc gamma Receptors", *Cáncer Res.* 57(18):8882-8890). La **Tabla 5** lista sustituciones sencillas, dobles, triples, cuádruples y quíntuples ejemplares (en relación con la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:1**) de la modificación ejemplar que incrementa la unión para activar los receptores y/o reducir la unión a los receptores de inhibición.

| Tabla 5                                                 |               |                                    |               |
|---------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------|
| Variaciones de las Regiones Fc de Activación Preferidas |               |                                    |               |
| Variaciones de un solo sitio                            |               |                                    |               |
| F243L                                                   | R292G         | D270E                              | R292P         |
| Y300L                                                   | P396L         |                                    |               |
| Variaciones de sitio doble                              |               |                                    |               |
| F243L y R292P                                           | F243L y Y300L | F243L y P396L                      | R292P y Y300L |
| D270E y P396L                                           | R292P y V305I | P396L y Q419H                      | P247L y N421K |
| R292P y P396L                                           | Y300L y P396L | R255L y P396L                      | R292P y P305I |
| K392T y P396L                                           |               |                                    |               |
| Variaciones de sitio triple                             |               |                                    |               |
| F243L, P247L y N421K                                    |               | P247L, D270E y N421K               |               |
| F243L, R292P y Y300L                                    |               | R255L, D270E y P396L               |               |
| F243L, R292P y V305I                                    |               | D270E, G316D y R416G               |               |
| F243L, R292P y P396L                                    |               | D270E, K392T y P396L               |               |
| F243L, Y300L y P396L                                    |               | D270E, P396L y Q419H               |               |
| V284M, R292L y K370N                                    |               | R292P, Y300L y P396L               |               |
| Variaciones de sitio cuádruple                          |               |                                    |               |
| L234F, F243L, R292P y Y300L                             |               | F243L, P247L, D270E y N421K        |               |
| L234F, F243L, R292P y Y300L                             |               | F243L, R255L, D270E y P396L        |               |
| L235I, F243L, R292P y Y300L                             |               | F243L, D270E, G316D y R416G        |               |
| L235Q, F243L, R292P y Y300L                             |               | F243L, D270E, K392T y P396L        |               |
| P247L, D270E, Y300L y N421K                             |               | F243L, R292P, Y300L, y P396L       |               |
| R255L, D270E, R292G y P396L                             |               | F243L, R292P, V305I y P396L        |               |
| R255L, D270E, Y300L y P396L                             |               | F243L, D270E, P396L y Q419H        |               |
| D270E, G316D, P396L y R416G                             |               |                                    |               |
| Variaciones de sitio quintuple                          |               |                                    |               |
| L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L                      |               | F243L, R292P, V305I, Y300L y P396L |               |
| L235P, F243L, R292P, Y300L y P396L                      |               |                                    |               |

**[00149]** Las variantes ejemplares de las Regiones de Fc de IgG1 de humano con unión reducida a CD32B y/o unión incrementada a CD16A contienen las sustituciones F243L, R292P, Y300L, V305I o P296L. Estas sustituciones de aminoácidos pueden

encontrarse presentes en una Región de Fc de IgG1 de humano en cualquier combinación. En una modalidad, la Región de Fc de IgG1 de humano variante contiene una sustitución F243L, R292P y Y300L. En otra modalidad, la región de Fc de IgG1 de humano  
 5 variante contiene una sustitución F243L, R292P, Y300L, V305I y P296L.

**[00150]** En ciertas modalidades, se prefiere para las Regiones de Fc de moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención que muestren una unión reducida (o sustancialmente  
 10 sin) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión mostrada por la Región de Fc de IgG1 de tipo silvestre (**SEQ ID NO:1**)). En una modalidad específica, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención comprenden una Región  
 15 de Fc de IgG que muestra una función efectora de ADCC reducida. En una modalidad preferida, los Dominios de CH2-CH3 de tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 incluyen cualquiera de 1, 2, 3, o 4 de las sustituciones: L234A, L235A, D265A, N297Q, y N297G. En otra modalidad, los Dominios de CH2-CH3  
 20 contienen una sustitución N297Q, una sustitución N297G, sustituciones L234A y L235A o una sustitución D265A, cuando estas mutaciones derogan la unión a FcR. Alternativamente, se utiliza un Dominio de CH2-CH3 de una Región de Fc de origen natural que muestra de forma simultánea una unión reducida (o  
 25 sustancialmente nula) a FcγRIIIA (CD16a) y/o función efectora

reducida (en relación con la unión y función efectora mostrada por la Región de Fc de IgG1 de tipo silvestre (**SEQ ID NO:1**)). En una modalidad específica, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención comprenden una Región de Fc de IgG2 (**SEQ ID NO:2**) o una Región de Fc de IgG4 (**SEQ ID:NO:4**). Cuando se utiliza una Región de Fc de IgG4, la invención instantánea también abarca la introducción de una mutación de estabilización, tal como la sustitución S228P en la Región de Bisagra descrita en lo anterior (véase, *por ejemplo*, **SEQ ID NO:36**). Puesto que las sustituciones N297G, N297Q, L234A, L235A y D265A derogan la función efectora, en circunstancias en las cuales se desea una función efectora, estas sustituciones de preferencia podrían no emplearse.

**[00151]** Una secuencia de IgG1 preferida para los Dominios de CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención que tienen una función efectora reducida o derogada comprenderán las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO:43**) :

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

en donde, X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[00152]** La vida media en suero de las proteínas que

comprenden las Regiones de Fc puede incrementarse al incrementar la afinidad de unión de la Región de Fc para FcRn. El término "vida media" como se utiliza en la presente significa una propiedad farmacocinética de una molécula que es

5 una medida del tiempo de supervivencia de las moléculas después de su administración. La vida media puede expresarse como el tiempo requerido para eliminar el cincuenta por ciento (50%) de una cantidad conocida de la molécula del cuerpo del sujeto (*por ejemplo, paciente humano u otro mamífero*) o un

10 compartimento específico del mismo, *por ejemplo, cuando se mide en suero, es decir, la vida media circulante, o en otros tejidos*. En general, un incremento en la vida media resulta en un incremento en el tiempo de residencia media (MRT) en circulación para la molécula administrada.

15 **[00153]** En algunas modalidades, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención comprenden una Región de Fc variante, en donde la Región de Fc variante comprende al menos una modificación de aminoácidos en relación con una Región de Fc de tipo silvestre, de modo que la molécula tenga

20 una vida media incrementada (en relación con una molécula que comprende una Región de Fc de tipo silvestre). En algunas modalidades, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención comprenden una Región de Fc de IgG1 variante, en donde la Región de Fc variante comprende una

25 sustitución de aminoácidos que prolonga la vida media en una o

más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435, y 436. Se conocen en  
5 la técnica numerosas mutaciones capaces de incrementar la vida media de una molécula que contiene una Región de Fc-e incluyen, por ejemplo M252Y, S254T, T256E, y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, véase las mutaciones descritas en las Patentes de los Estados Unidos No. 6,277,375, 7,083,784; 7,217,797,  
10 8,088,376; Publicaciones de los Estados Unidos Nos. 2002/0147311; 2007/0148164; y Publicaciones Internacionales Nos. WO 98/23289; WO 2009/058492; y WO 2010/033279, las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad. Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 con vida media  
15 intensificada también incluyen aquellas que poseen Regiones de Fc variantes que comprenden sustituciones en dos o más de los residuos 250, 252, 254, 256, 257, 288, 307, 308, 309, 311, 378, 428, 433, 434, 435 y 436 de la Región de Fc. En particular, dos o más sustituciones seleccionadas de: T250Q, M252Y, S254T,  
20 T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, H435K, e Y436I.

**[00154]** En una modalidad específica, una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 posee una Región de Fc de IgG variante que comprende las sustituciones de:

25 (A) M252Y, S254T y T256E;

- (B) M252Y y S254T;
- (C) M252Y y T256E;
- (D) T250Q y M428L;
- (E) T307Q y N434A;
- 5 (F) A378V y N434A;
- (G) N434A y Y436I;
- (H) V308P y N434A; o
- (I) K288D y H435K.

**[00155]** En una modalidad preferida, las moléculas  
 10 biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 poseen una región de Fc de IgG  
 variante que comprende cualquiera de 1, 2, o 3 de las  
 sustituciones: M252Y, S254T y T256E. La invención además abarca  
 las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que poseen las  
 regiones de Fc variantes que comprenden:

- 15 (A) una o más mutaciones que alteran la función  
 efectora y/o FcγR; y
- (B) una o más mutaciones que extienden la vida media en  
 suero.

**[00156]** Una secuencia de IgG1 preferida para los Dominios de  
 20 CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la Región de Fc de la  
 presente invención tienen una vida media en suero incrementada  
 que comprenderá las sustituciones M252Y, S254T y T256E (**SEQ ID**  
**NO: 80**) :

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 25 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

en donde, X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

5 **[00157]** Como se observará, los Dominios de CH2-CH3 de **SEQ ID NO:80** incluyen sustituciones en las posiciones 234 y 235 con alanina, y de este modo forman una Región de Fc que muestra una unión reducida (o sustancialmente nula) a FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o FcγRIIIB  
 10 (CD16b) (en relación con la unión mostrada por la Región de Fc de tipo silvestre (**SEQ ID NO:1**)). La invención también abarca tales Dominios de CH2-CH3 de IgG1, que comprenden los residuos de alanina de tipo silvestre, sustituciones alternativas y/o adicionales que modifican la función efectora y/o actividad de  
 15 unión de FcγR de la Región de Fc.

**[00158]** Una secuencia de IgG4 preferida para los Dominios de CH2 y CH3 de las moléculas que contienen la Región de Fc de la presente invención que tiene una vida media incrementada en suero comprenderán las sustituciones M252Y, S254T y T256E (**SEQ**  
 20 **ID NO:81**):

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE  
 25 ALHNHYTQKS LSLSLGX

en donde, X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[00159]** Para ciertos anticuerpos, diacuerpos y moléculas de unión trivalente aquellas primera y tercera cadenas de polipéptidos que contienen la Región de Fc no son idénticas, es deseable prevenir o reducir la aparición de homodimerización en los Dominios de CH2-CH3 de las dos primeras cadenas de polipéptidos o entre los Dominios de CH2-CH3 de las dos terceras cadenas de polipéptidos. Los Dominios de CH2 y/o CH3 de tales cadenas de polipéptidos no necesitan ser de secuencia idéntica, y se modifican de forma ventajosa para reforzar el acomplejamiento entre las dos cadenas de polipéptidos. Por ejemplo, puede introducirse una sustitución de aminoácidos (de preferencia una sustitución con un aminoácido que comprenda un grupo lateral voluminoso que forme una "perilla", *por ejemplo*, triptófano) en el Dominio de CH2 o CH3 de modo que la interferencia estérica evitará la interacción con un dominio mutado de forma similar y obligará al dominio mutado a aparearse con un dominio en el cual se haya diseñado una mutación complementaria o de acomodación, *es decir*, "el orificio" (*por ejemplo*, una sustitución con glicina). Tales conjuntos de mutaciones pueden diseñarse en cualquier par de polipéptidos que comprendan Dominios de CH2-CH3 que formen una Región de Fc para reforzar la heterodimerización. Los métodos de diseño de proteínas para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización se conocen bien en la técnica, en

particular con respecto al diseño de moléculas similares a inmunoglobulina, y se abarcan en la presente (véase por ejemplo, Ridgway et al. (1996) "*'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Hard Chain Heterodimerization*", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library*", J. Mol. Biol. 270: 26-35, y Xie et al. (2005) "*A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression and Tumor Cell Lysis*", J. Immunol. Methods 296:95-101; cada uno de los cuales se incorpora en la presente para referencia en su totalidad).

**[00160]** Una perilla preferida se crea al modificar una Región de Fc de IgG que contenga las modificaciones T366W. Un orificio preferido se crea al modificar una Región de Fc de IgG que contenga la modificación T366S, L368A y Y407V. para ayudar a purificar el homodímero de la tercera cadena de polipéptidos que porta el orificio a partir de la molécula biespecífica final que porta la Región de Fc heterodimérica, el sitio de unión a la proteína A de los Dominios de CH2 y CH3 que porta el orificio de la tercera cadena de polipéptidos se hizo mutar de preferencia por una sustitución de aminoácidos en la posición 435 (H435R). De este modo, el homodímero de la tercera cadena de polipéptidos que porta el orificio no se unirá a la proteína A, mientras que el heterodímero biespecífico retendrá su capacidad de unir la proteína A mediante el sitio de unión

a la proteína A en la primera cadena de polipéptidos. En una modalidad alternativa, la tercera cadena de polipéptidos que porta el orificio puede incorporar sustituciones de aminoácidos en las posiciones 434 y 435 (N434A/N435K).

- 5 **[00161]** Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para los Dominios de CH2 y CH3 de la primera cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc de la presente invención tendrá la secuencia **"que porta la perilla"** (SEQ ID NO:44) :

10 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE  
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

- 15 en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

- [00162]** Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida para los Dominios de CH2 y CH3 de la segunda cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc de la presente invención que tiene dos cadenas de polipéptidos (o la tercera
- 20 cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc que tiene tres, cuatro, o cinco cadenas de polipéptidos) tendrá la secuencia **"que porta el orificio"** (SEQ ID NO:45) :

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 25 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE

WESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNRYTQKS LSLSPGX

en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[00163]** Como se observará, los Dominios de CH2-CH3 de **SEQ ID**  
 5 **NO:44**, y **SEQ ID NO:45** incluyen sustituciones en las posiciones  
 234 y 235 con alanina, y de este modo forman una Región de Fc  
 que muestra unión reducida (o sustancialmente nula) a FcγRIA  
 (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) o  
 FcγRIIIB (CD16b) (en relación con la unión mostrada por la  
 10 Región de Fc de tipo silvestre (**SEQ ID NO:1**)). La invención  
 también abarca tales Dominios de CH2-CH3 de IgG1, que  
 comprenden los residuos de alanina de tipo silvestre,  
 sustituciones alternativas y/o adicionales que modifican la  
 función efectora y/o actividad de unión a FcγR de la Región de  
 15 Fc. La invención también abarca tales Dominios de CH2-CH3, que  
 además comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que  
 prolongan la vida media. En particular, como se proporciona en  
 lo anterior, la invención abarca tales Dominios de CH2-CH3 que  
 llevan el orificio y tales que llevan la perilla que además  
 20 comprenden la M252Y/S254T/T256E.

**[00164]** Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida, para  
 los Dominios de CH2 y CH3 además comprende M252Y/S254T/T256E,  
 de la primera cadena de polipéptidos de una molécula que  
 contiene la Región de Fc de la presente invención tendrá la  
 25 secuencia "**que porta la perilla**" (**SEQ ID NO:82**):

APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 5 ALHNHYTQKS LSLSPGX

en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[00165]** Una secuencia de aminoácidos de IgG1 preferida, para  
 los Dominios de CH2 y CH3 además comprende M252Y/S254T/T256E,  
 de la segunda cadena de polipéptidos de una molécula que  
 10 contiene la Región de Fc de la presente invención que tiene  
 dos cadenas de polipéptidos (o la tercera cadena de  
 polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc que  
 tiene tres, cuatro, o cinco cadenas de polipéptidos) tendrá la  
 secuencia **"que porta el orificio"** (SEQ ID NO:83):

15 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
 ALHNRYTQKS LSLSPGX

20 en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[00166]** Una secuencia de aminoácidos de IgG4 preferida para  
 los Dominios de CH2 y CH3, que comprende M252Y/S254T/T256E, de  
 la primera cadena de polipéptidos de una molécula que contiene  
 la Región de Fc de la presente invención tendrá la secuencia  
 25 **"que porta la perilla"** (SEQ ID NO:84):

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
 5 ALHNHYTQKS LSLSLGX

en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[00167]** Una secuencia de aminoácidos de IgG4 preferida , para  
 los Dominios de CH2 y CH3 que comprenden M252Y/S254T/T256E, de  
 la segunda cadena de polipéptidos de una molécula que contiene  
 10 la Región de Fc de la presente invención que tiene dos cadenas  
 de polipéptidos (o la tercera cadena de polipéptidos de una  
 molécula que contiene la Región de Fc que tiene tres, cuatro,  
 o cinco cadenas de polipéptidos) tendrá la secuencia **"que porta  
 el orificio"** (SEQ ID NO:85):

15 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
 ALHNRYTQKS LSLSLGX

20 en donde X es una lisina (K) o se encuentra ausente.

**[00168]** Como se observará, los Dominios de CH2-CH3 de **SEQ ID  
 NO:84**, y **SEQ ID NO:85** incluyen las sustituciones  
 M252Y/S254T/T256E, y de este modo forman una Región de Fc de  
 IgG4 que muestra una vida en suero incrementada. La invención  
 25 también abarca Dominios de CH2-CH3 de IgG4, que comprenden los

residuos M252/S254/T256 de tipo silvestre.

[00169] Se prefiere que la primera cadena de polipéptidos tenga una secuencia de CH2-CH3 "que porta la perilla", tal como aquella de **SEQ ID NO:44**. Sin embargo, como se reconocerá, un

5 Dominio de CH2CH3 "que porta el orificio" (*por ejemplo*, **SEQ ID NO:45**) podría emplearse en la primera cadena de polipéptidos, en cuyo caso, un Dominio de CH2-CH3 "que porta la perilla" (*por ejemplo*, **SEQ ID NO:44**) podría emplearse en la segunda cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc

10 de la presente invención que tiene dos cadenas de polipéptidos (o en la tercera cadena de polipéptidos de una molécula que contiene la Región de Fc que tiene tres, cuatro, o cinco cadenas de polipéptidos).

[00170] En otras modalidades, la invención abarca moléculas

15 biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que comprenden los Dominios de CH2 y/o CH3 que se han diseñado para favorecer la heterodimerización sobre la homodimerización utilizando mutaciones conocidas en la técnica, tales como aquellas descritas en las Publicaciones PCT No. WO 2007/110205; WO

20 2011/143545; WO 2012/058768; WO 2013/06867, todas de las cuales se incorporan en la presente para referencia en su totalidad.

## **VI. Capacidades de Unión a Anti-PD1**

[00171] Se conocen anticuerpos que son inmunoespecíficos para

25 PD-1 (véase, *por ejemplo*, Solicitudes de Patentes de los

Estados Unidos No. 62/198,867; 62/239,559; 62/255,140 Patentes de los Estados Unidos No. 8,008,449; 8,552,154; Publicaciones de Patente PCT WO 2012/135408; WO 2012/145549; y WO 2013/014668). Las capacidades de unión a PD-1 preferidas útiles  
 5 en la generación de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención son capaces de unirse a una porción continua o discontinua (*por ejemplo*, conformacional) (**epítipo**) de PD-1 de humano (CD279) y de preferencia también mostrará la capacidad de unir moléculas de PD-1 de una o más especies no  
 10 humanas, en particular, especies de primate (y especialmente una especie de primate, tal como mono cynomolgus). Los anticuerpos deseados adicionales pueden elaborarse al aislar hibridomas que secretan anticuerpos obtenidos al utilizar PD-1 o un fragmento de péptido del mismo. Un polipéptido de PD-1  
 15 de humano representativo (Secuencia NCBI NP\_005009.2; que incluye una secuencia de señal de 20 residuos de aminoácidos, mostrada en subrayado) y la proteína madura de 268 residuos de aminoácidos) tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:46**):

**MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR** PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA  
 20 TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL  
 PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE  
 VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI  
 GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT  
 IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE

[00172] Las moléculas de unión anti-PD-1 preferidas (*por ejemplo*, anticuerpos) útiles en la generación de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención instantánea posee los Dominios de VL y/o VH del anticuerpo monoclonal de

5 PD-1 anti-humano **"mAb de PD-1"** (nivolumab, Registro CAS No.:946414-94-4, también conocido como 5C4, BMS-936558, ONO-4538, MDX-1106, y comercializado como OPDIVO® por Bristol-Myers Squibb); **"mAb de PD-2"** (pembrolizumab, (anteriormente conocido como lambrolizumab), Registro CAS No.:1374853-91-4, también

10 conocido como MK-3475, SCH-900475, y comercializado como KEYTRUDA® por Merck); **"mAb de PD-3"** (EH12.2H7; Dana Farber), **"mAb de PD-4"** (pidilizumab, Registro CAS No.: 1036730-42-3 también conocido como CT-011, CureTech,)), o cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 de la **Tabla 6**; y de mayor preferencia

15 poseen 1, 2 o las 3 CDR<sub>L</sub> de la Región VL y/o 1, 2 o las 3 de las CDR<sub>H</sub> del Dominio de VH de tales anticuerpos monoclonales de anti-PD-1. Se han identificado de forma reciente anticuerpos anti-PD-1 adicionales que poseen características de unión únicas útiles en los métodos y composiciones de las invenciones

20 instantáneas (véase, Solicitudes de Patentes de los Estados Unidos Nos. 62/198,867; 62/239,559; 62/255,140). En particular, se prefieren moléculas de unión de PD-1 que poseen un Dominio de VH y/o de VL humanizado del anticuerpo anti-PD-

1 **"mAb de PD-5"** (mAb de hPD-2, MacroGenics); **"mAb de PD-1 de**

25 **6"** (mAb de hPD-7, MacroGenics); **"mAb de PD-7"** (mAb de hPD-9,

MacroGenics); o "mAb de PD-8" mAb de hPD-15, MacroGenics); y de mayor preferencia poseen 1, 2 o las 3 CDR<sub>L</sub> de la Región de VL y/o 1, 2 o las 3 de las CDR<sub>H</sub> del Dominio de VH de tales anticuerpos monoclonales de anti-PD-1 humanizados.

5

#### A. mAb 1 de PD-1

[00173] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb 1 de PD-1 (SEQ ID NO:47) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

10 QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV  
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND  
DYWGQGTLVT VSS

[00174] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb 1 de PD-1 (SEQ ID NO:48) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

15 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD  
ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ  
 GTKVEIK

#### 20 B. mAb 2 de PD-1

[00175] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb 2 de PD-1 (SEQ ID NO:49) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

25 QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG  
INPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD

YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

[00176] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb 2 de PD-1 (**SEQ ID NO:50**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

5 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL  
LIYLASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL  
TFGGGTKVEIK

#### C. mAb 3 de PD-1

[00177] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb 3 de PD-1 (**SEQ ID NO:51**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY  
IYPSTGFTEY NQKFDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARRWR  
DSSGYHAMDY WGQGTSTVTVSS

15 [00178] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb 3 de PD-1 (**SEQ ID NO:52**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT ISCRASQSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL  
LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY  
20 TFGGGTKLEI K

#### D. mAb 4 de PD-1

[00179] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb 4 de PD-1 (**SEQ ID NO:53**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWVRQA PGQGLQWMGW  
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMVFCVRVG  
YDALDYWGQG TLVTVSS

[00180] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb  
 5 4 de PD-1 (**SEQ ID NO:54**) se muestra a continuación (los residuos  
 de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

EIVLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCSARSSVS YMHWFQQKPG KAPKLWIYRT  
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSIQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG  
 TKLEIK

10

#### E. mAb 5 de PD-1

[00181] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb  
 5 de PD-1 (**SEQ ID NO:55**) se muestra a continuación (los residuos  
 de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

15 EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY  
ISSGSMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTEG TALIYCASLS  
DYFDYWGQGT TVTVSS

[00182] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb  
 5 de PD-1 (**SEQ ID NO:56**) se muestra a continuación (los residuos  
 20 de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

DVVMTQSPPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLHW YLQKPGQSPQ  
 LLIYRVSNRF SGVPDRFGSG GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTTHVP  
WTFGQGTKLE IK

#### 25 F. mAb 6 de PD-1

**[00183]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:57**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWX<sub>1</sub>GV  
 5 IHPDSETWL DQFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREEH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

en donde X<sub>1</sub> es I o A

**[00184]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:58**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRAX<sub>1</sub>ESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASN<sub>2</sub>GS GVPSRFGSGG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGTKVEI K

en donde: X<sub>1</sub> es N o S y X<sub>2</sub> es Q o R; o

15 X<sub>1</sub> es N y X<sub>2</sub> es Q; o

X<sub>1</sub> es S y X<sub>2</sub> es Q; o

X<sub>1</sub> es S y X<sub>2</sub> es R

**[00185]** En modalidades particulares, la secuencia de aminoácidos de mAb 6 de PD-1 comprende:

- 20 (a) **SEQ ID NO:57**, en donde X<sub>1</sub> es I; y **SEQ ID NO:58**, en donde X<sub>1</sub> es N y X<sub>2</sub> es Q; o
- (b) **SEQ ID NO:57**, en donde X<sub>1</sub> es I; y **SEQ ID NO:58**, en donde X<sub>1</sub> es S y X<sub>2</sub> es Q.

**[00186]** Un Dominio de VH anti-PD-1 designado "mAb de VH de 6-I de PD-1" comprende **SEQ ID NO:57** en donde X<sub>1</sub> es I y tiene

la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:86**):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

- 5 **[00187]** Un Dominio de VL anti-PD-1 ejemplar designado "**mAb de VL de 6-SQ de PD-1**" comprende **SEQ ID NO:58** en donde  $X_1$  es S y  $X_2$  es Q y tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:87**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY

10 TFGGGTKVEI K

**[00188]** Un anticuerpo anti-PD-1 ejemplar que posee un Dominio de mAb de VH de 6-I de PD-1 y un Dominio de mAb de VL de 6-SQ de PD-1 se designa como "**mAb de 6-ISQ de PD-1**"

15 **G. mAb 7 de PD-1**

**[00189]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb 7 de PD-1 (**SEQ ID NO:59**) se muestra a continuación (los residuos CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

EVQLVESGGG LX<sub>1</sub>RPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVX<sub>2</sub>WVRQA PGKGLEWX<sub>3</sub>AT  
20 ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSX<sub>4</sub>RAED TATYYCARYYG  
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

en donde:  $X_1$  es V o A;  $X_2$  es S o G;  $X_3$  es V o T;  $X_4$  es L o A; o

$X_1$  es V,  $X_2$  es S,  $X_3$  es V, y  $X_4$  es L; o

25  $X_1$  es A,  $X_2$  es G,  $X_3$  es T, y  $X_4$  es A

**[00190]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb 7 de PD-1 (**SEQ ID NO: 60**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY X<sub>1</sub>YLAWYQQKP GKAPKLLIYX<sub>2</sub>  
 5 AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ  
 GTKLEIK

en donde: X<sub>1</sub> es S o N y X<sub>2</sub> es N o D; o X<sub>1</sub> es S y X<sub>2</sub> es N;  
 o

X<sub>1</sub> es N y X<sub>2</sub> es D

10 **[00191]** En modalidades particulares, mAb 7 de PD-1 comprende:

(a) **SEQ ID NO: 59**, en donde X<sub>1</sub> es V, X<sub>2</sub> es S, X<sub>3</sub> es V, y X<sub>4</sub> es L; y **SEQ ID NO: 60**, en donde X<sub>1</sub> es S y X<sub>2</sub> es N; o

(b) **SEQ ID NO: 59**, en donde X<sub>1</sub> es A, X<sub>2</sub> es G, X<sub>3</sub> es T, y X<sub>4</sub> es A; y **SEQ ID NO: 60**, en donde X<sub>1</sub> es N y X<sub>2</sub> es D.  
 15

#### H. mAb 8 de PD-1

**[00192]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb 8 de PD-1 (**SEQ ID NO: 61**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA  
ISGGGADTY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG  
TYAMDYWGQG TLVTVSS

25 **[00193]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb

8 de PD-1 (**SEQ ID NO:62**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC**RASENIY NYLAWYQQKP** GKAPKLLIY**D**

**AKTLAA**GVPS RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYC**QH** **HYAVPWT**FGQ

5 GTKLEIK

### I. Anticuerpos Anti-PD-1 Adicionales

**[00194]** Los anticuerpos anti-PD-1 adicionales que pueden utilizarse para generar las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención instantánea se proporcionan en la **Tabla 6**.

| <b>Tabla 6: Anticuerpos Anti-PD-1 Adicionales</b>                                                                 |                                                                                                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Anticuerpos de PD-1</b>                                                                                        | <b>Referencia/Fuente</b>                                                                                              |
| PD1-17; PD1-28; PD1-33; PD1-35; y PD1-F2                                                                          | Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,488,802; 7,521,051; y 8,088,905; Publicaciones de Patente de PCT WO 2004/056875 |
| 17D8; 2D3; 4H1; 5C4; 4A11; 7D3; y 5F4                                                                             | Patentes de los Estados Unidos Nos. 8,008,449; 8,779,105; y 9,084,776; Publicaciones de Patente de PCT WO 2006/121168 |
| hPD-1.08A; hPD-1.09A; 109A; K09A; 409A; h409A11; h409A16; h409A17; Codón optimizado 109A; y Codón optimizado 409A | Patentes de los Estados Unidos Nos. 8,354,509; 8,900,587; y 5,952,136; Publicaciones de Patente de PCT WO 2008/156712 |

| <b>Tabla 6: Anticuerpos Anti-PD-1 Adicionales</b>                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Anticuerpos de PD-1</b>                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>Referencia/Fuente</b>                                                                                  |
| 1E3; 1E8; y 1H3                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014/0044738; Publicaciones de Patente de PCT WO 2012/145493 |
| 9A2; 10B11; 6E9; APE1922; APE1923; APE1924; APE1950; APE1963; y APE2058                                                                                                                                                                                                                                  | Publicación de Patente PCT WO 2014/179664                                                                 |
| GA1; GA2; GB1; GB6; GH1; A2; C7; H7; SH-A4; SH-A9; RG1H10; RG1H11; RG2H7; RG2H10; RG3E12; RG4A6; RG5D9; RG1H10-H2A-22-1S; RG1H10-H2A-27-2S; RG1H10-3C; RG1H10-16C; RG1H10-17C; RG1H10-19C; RG1H10-21C; y RG1H10-23C2                                                                                     | Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014/0356363; Publicaciones de Patente de PCT WO 2014/194302 |
| H1M7789N; H1M7799N; H1M7800N; H2M7780N; H2M7788N; H2M7790N; H2M7791N; H2M7794N; H2M7795N; H2M7796N; H2M7798N; H4H9019P; H4xH9034P2; H4xH9035P2; H4xH9037P2; H4xH9045P2; H4xH9048P2; H4H9057P2; H4H9068P2; H4xH9119P2; H4xH9120P2; H4Xh9128p2; H4Xh9135p2; H4Xh9145p2; H4Xh8992p; H4Xh8999p; y H4Xh9008p; | Publicación de Patente de los Estados Unidos 2015/0203579; Publicaciones de Patente de PCT WO 2015/112800 |
| MAB 1 de PD-1; mAb de PD-2; mAb de hPD-2; mAb de PD-3; mAb de PD-4; mAb de PD-5; mAb de PD-1 de 6; mAb de PD-7; hMAB de PD-7; mAb de PD-8; PD-1 mAb 9; mAb de hPD-9; mAb 1 de PD-10; mAb 1 de PD-11; mAb 1 de PD-12; mAb 1 de PD-13; mAb 1 de PD-14; mAb 1 de PD-15; y mAb 1 de hPD-15                   | Solicitudes de Patente de los Estados Unidos No. 62/198,867 y 62/239,559                                  |

#### J. Anticuerpos anti-PD-1 Ejemplares

[00195] Un anticuerpo anti-PD-1 ejemplar designado “**MAB 6 de G4P de PD-1**” comprende: una cadena pesada que tiene el Dominio

de VH de mAb de PD-1 de 6I (**SEQ ID NO:86**), un Dominio de CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO:42**), Dominios de Bisagra de IgG4 (**SEQ ID NO:36**), y de CH2-CH3 de IgG4 estabilizados que carecen de la lisina C-terminal (**SEQ ID NO:4**); y una cadena ligera que tiene  
 5 el Dominio de VL de mAb de PD-1 de 6SQ (**SEQ ID NO:87**) y una CL kappa (**SEQ ID NO:38**).

**[00196]** La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de mAb 6 de G4P de PD-1(**SEQ ID NO:88**) se muestra a continuación.

10 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV  
 IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH  
 YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD  
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTKTY  
 TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA PEF LGGPSVF LFPPKPKDTL  
 15 MISRTPEVTC VVVDVSQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR  
 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKGLPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL  
 PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD  
 GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLG

**[00197]** La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera  
 20 competa de mAb 6 de G4P de PD-1(**SEQ ID NO:89**) se muestra a continuación.

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
 25 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV

THQGLSSPVT KSFNRGEC

**VII. Capacidades de Unión Anti-CTLA-4**

[00198] Se conocen los anticuerpos que son inmunoespecíficos  
5 para CTLA-4 (véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos  
No. 6,984,720; 6,682,736; 7,034,121; 7,109,003; 7,132,281;  
7,411,057; 7,605,238; 7,807,797; 7,824,679; 8,017,114;  
8,143,379; 8,318,916; 8,491,895; 8,784,815; y 8,883,984  
Publicaciones de Patente de los Estados Unidos 2009/0123477;  
10 2009/0252741; y 2014/0105914; Publicaciones de Patente PCT No.  
WO 00/37504; WO 01/14424; WO 01/54732; WO 2006/029219; WO  
2006/066568; y WO 2012/120125; y **Tabla 7**). Las capacidades de  
unión a CTLA-4 preferidas útiles en la generación de las  
moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente  
15 invención son capaces de unirse a una porción de CTLA-4 de  
humano continua o discontinua (*por ejemplo*, conformacional)  
(**epítopo**) y de preferencia también mostrará la capacidad de  
unirse a moléculas de CTLA-4 de una o más especies no humanas,  
en particular, especies de primate (y especialmente una especie  
20 de primate, tal como la de mono cynomolgus). Pueden hacerse  
anticuerpos adicionales ejemplares al aislar hibridomas que  
secretan el anticuerpo obtenido utilizando CTLA-4 o un  
fragmento de péptido de la misma. Un polipéptido de CTLA-4 de  
humano representativo (Secuencia NCBI NP\_005205.2; incluye una  
25 secuencia de señal de 35 residuos de aminoácidos (se muestra

subrayada) y los 188 residuos de aminoácidos de la proteína madura) que tiene la secuencia de aminoácidos (**SEQ ID NO:75**):

**MACLGFORHK AQLNLATRTW PCTLLFFLLF IPVFC**KAMHV AQPAVVLASS  
 RGIASFVCEY ASPGKATEVR VTVLRQADSQ VTEVCAATYM MGNELTFLDD  
 5 SICTGTSSGN QVNLTIQGLR AMDTGLYICK VELMYPPPY LIGINGTQIY  
 VIDPEPCPDS DFLWILA AV SSGLFFYSFL LTAVSLSKML KKRSP LTTGV  
 YVKMPPTPE CEKQFQPYFI PIN

**[00199]** Las moléculas de unión anti-CTLA-4 preferidas (por ejemplo, anticuerpos) útiles en la generación de las moléculas  
 10 biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención instantánea poseen los Dominios de VL y/o VH del anticuerpo monoclonal CTLA-4 anti-humano "**mAb 1 de CTLA-4**" (ipilimumab, Registro CAS No.: 477202-00-9, también conocido como MDX010, y comercializado como YERVOY® por Bristol-Myers Squibb); "**mAb 2**  
 15 **de CTLA-4**" (tremelimumab, Registro CAS No.: 745013-59-6, también conocido como CP-675206); "**mAb 3 de CTLA-4**" (4B6 como se proporciona en la **Tabla 7**) o cualquiera de los demás anticuerpos anti-CTLA-4 de la **Tabla 7**; y de mayor preferencia poseen 1, 2 o las 3 CDR<sub>L</sub> de la Región VL y/o 1, 2 o las 3 CDR<sub>H</sub>  
 20 del Dominio de VH de tales anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4.

#### **A. mAb 1 de CTLA-4**

**[00200]** La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb  
 25 1 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:76**) se muestra a continuación (los

residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF  
ISYDGNNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG  
WLGPFDYWGQ GTLVTVSS

- 5 [00201] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb  
 1 de CTLA-4 (SEQ ID NO:77) se muestra a continuación (los  
 residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY  
GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
 10 QGTKVEIK

#### B. mAb 2 de CTLA-4

- [00202] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb  
 2 de CTLA-4 (SEQ ID NO:78) se muestra a continuación (los  
 15 residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV  
IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP  
RGATLYYYYY GMDVWGQGT VTVSS

- [00203] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb  
 20 2 de CTLA-4 (SEQ ID NO:79) se muestra a continuación (los  
 residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIN SYLDWYQQKP GKAPKLLIYA  
ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP  
 GTKVEIK

### C. mAb 3 de CTLA-4

[00204] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VH de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:90**) se muestra a continuación (los residuos de CDR<sub>H</sub> se muestran subrayados).

5 QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF  
ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG  
WLGPFDYWGQ GTLVTVSS

[00205] La secuencia de aminoácidos del Dominio de VL de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:91**) se muestra a continuación (los  
 10 residuos de CDR<sub>L</sub> se muestran subrayados).

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY  
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
 QGTKVEIK

### 15 D. Anticuerpos Anti-CTLA-4 Adicionales

[00206] Los anticuerpos anti-CTLA-4 adicionales que pueden utilizarse para generar las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención instantánea se proporcionan en la **Tabla 7**.

| Tabla 7: Anticuerpos Anti-CTLA-4 Adicionales |                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Anticuerpos de CTLA-4                        | Referencia/Fuente                                                                                                                        |
| mAb 26                                       | Patente de los Estados Unidos No. 7,034,121; Publicaciones de Patente de PCT WO 01/54732                                                 |
| 10D1; 1E2; y 4B6                             | Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,984,720; 7,605,238; 8,017,114; 8,318,916; y 8,784,815; Publicaciones de Patente de PCT WO 01/14424 |

| <b>Tabla 7: Anticuerpos Anti-CTLA-4 Adicionales</b>                                                                                                   |                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Anticuerpos de CTLA-4</b>                                                                                                                          | <b>Referencia/Fuente</b>                                                                                                                                                             |
| 2.1.3; 3.1.1; 4.1.1; 4.8.1;<br>4.9.1; 4.10.2; 4.13.1;<br>4.14.3; 6.1.1; 11.2.1;<br>11.6.1; 11.7.1; 12.2.1;<br>12.3.1; 12.3.1.1; 12.9.1; y<br>12.9.1.1 | Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,682,736; 7,109,003; 7,132,281; 7,411,057; 7,807,797; 7,824,679; 8,143,379; 8,491,895; y 8,883,984; Publicaciones de Patente de PCT WO 00/37504 |
| 3B10; 8H5; 8H5-1B1; 3B10-4F7; 7B9-1A3; 2C7-1G10; 3B10-6E3; y 8H5-1A1                                                                                  | Publicación de Patente de los Estados Unidos 2014/0105914; Publicaciones de Patente de PCT WO 2012/120125                                                                            |
| 3.7F10A2; 4.3F6B5; 4.4A7F4; 4.6C1E3; 4.7A8H8; 4.7E11F1; 4.8H10H5; TGN2122; y TGN2422                                                                  | Publicación de Patente de los Estados Unidos 2009/0123477; Publicaciones de Patente de PCT WO 2006/066568                                                                            |
| L3D10; L1B11; K4G4; KM10; y YL2                                                                                                                       | Publicación de Patente de los Estados Unidos 2009/0252741; Publicaciones de Patente de PCT WO 2006/029219                                                                            |

#### **E. Anticuerpos anti-CTLA-4 ejemplares**

[00207] Un anticuerpo anti-CTLA-4 ejemplar designado "mAb 3 de G1AA de CTLA-4" comprende una cadena pesada que tiene el

5 Dominio de VH de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:90**), un Dominio de CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO:40**), Dominios de Bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO:33**), y de CH2-CH3 de IgG1 de las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO:43**).

[00208] La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada

10 completa de mAb 3 de G1AA de CTLA-4 (**SEQ ID NO:92**) se muestra a continuación.

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF  
ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG

WLGPFDYWGO GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY  
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI  
 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST  
 5 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY  
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD  
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

**[00209]** Un anticuerpo anti-CTLA-4 ejemplar alternativo  
 designado "**mAb 3 de G4P de CTLA-4**" comprende una cadena pesada  
 10 que tiene el Dominio de VH de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:90**),  
 un Dominio de CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO:42**), Dominios de Bisagra  
 de IgG4 (**SEQ ID NO:36**), y CH2-CH3 de IgG4 estabilizados que  
 carecen de la lisina C-terminal (**SEQ ID NO:4**). La secuencia de  
 aminoácidos de la cadena pesada completa de mAb 3 de G4P de  
 15 CTLA-4 se muestra a continuación (**SEQ ID NO:93**).

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF  
 ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG  
 WLGPFDYWGO GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY  
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGKTKYT  
 20 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPPCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM  
 ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV  
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF  
 PSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG  
 SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSLG

25 **[00210]** La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera

completa de mAb 3 de G1AA de CTLA-4 y de mAb 3 de G4P de CTLA-4 (**SEQ ID NO:94**) se muestra a continuación.

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY  
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
 5 QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK  
 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TLSKADYEKH KUYACEVTHQ  
 GLSSPVTKSF NRGEC

**[00211]** Los anticuerpos anti-CTLA-4 ejemplares, mAb 3 de G1AA de CTLA-4 y mAb 3 de G4P de CTLA-4, ambos comprenden una  
 10 cadena ligera que tiene el Dominio de VL de mAb 3 de CTLA-4 (**SEQ ID NO:91**) y un CL kappa (**SEQ ID NO:38**).

#### **VIII. Moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 Ejemplares**

**A. Diacuerpos que contienen la Región de Fc de cuatro**  
 15 **cadenas ejemplares que tienen Hélices E/K**

**[00212]** Se generaron tres diacuerpos biespecíficos que contienen la Región de Fc de cuatro cadenas de PD-1 x CTLA-4 ejemplares, que comprenden los Dominios Promotores de Heterodímeros con hélices E/K (designados "**DART B**", "**DART C**",  
 20 y "**DART D**"). La estructura de estos diacuerpos que contienen la Región de Fc se detalla a continuación. Estos diacuerpos de PD-1 x CTLA-4 pretenden ilustrarse, pero no limitar de ninguna forma, el alcance de la invención.

25 **1. DART B**

**[00213]** DART B es el diacuerpo A biespecífico que contiene la Región Fc de cuatro cadenas que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para CTLA-4, una región de Fc de IgG4 variante diseñada para prolongar la vida media, y Dominios Promotores de Heterodímeros de hélice E/K. La primera y tercera cadenas de polipéptidos de DART B comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CTLA-4 (mAb 1 de VL<sub>CTLA-4</sub> de CTLA-4 de VL) (**SEQ ID NO:77**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:5)**); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (mAb VH<sub>PD-1</sub> de PD-6-I de VH) (**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención que contiene cisteína (**Enlazador 2: GGCGGG (SEQ ID NO:6)**); un Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**)); una Región de Bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO:36**); una variante de un Dominio de CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO:81**); y un C-término.

**[00214]** La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas de polipéptidos de DART B es (**SEQ ID NO:95**):

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY  
 GAFSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYSFTSYWM

NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK STSTAYMELS  
 SLRSEDNAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTL VTVSSGGCGG GEVAACEKEV  
 AALEKEVAAL EKEVAALEKE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD  
 TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST  
 5 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY  
 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD  
 SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG

**[00215]** La segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART  
 B comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-  
 10 término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de  
 unirse a un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID**  
**NO:87**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:**  
 GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo  
 monoclonal capaz de unirse CTLA-4 (VH<sub>CTLA-4</sub> de mAb 1 de CTLA-4  
 15 VH) (**SEQ ID NO:76**); un péptido enlazador de intervención que  
 contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un  
 Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice  
 K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:21**); y un C-  
 término.

20 **[00216]** La secuencia de aminoácidos de la segunda y cuarta  
 cadenas de polipéptidos de DART B es (**SEQ ID NO:96**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS  
 25 YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGNNKYIA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL

QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSGGC GGGKVAACKE  
KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

## 2. DART C

**[00217]** DART C es el diacuerpo A biespecífico que contiene  
5 la Región Fc de cuatro cadenas que tiene dos sitios de unión  
específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para  
CTLA-4, una región de Fc de IgG4 variante diseñada para  
prolongar la vida media, y Dominios Promotores de Heterodímeros  
de hélice E/K. La primera y tercera cadenas de polipéptidos de  
10 DART C comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-  
término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de  
unirse a CTLA-4 (VL<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 de VL) (**SEQ ID**  
**NO:91**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:**  
GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo  
15 monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de  
6-I de VH) (**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención  
que contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un  
Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice  
E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**)); una  
20 Región de Bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO:36**); una  
variante de un Dominio de CH2-CH3 de IgG4 que comprende las  
sustituciones M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-  
terminal (**SEQ ID NO:81**); y un C-término.

**[00218]** La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera  
25 cadenas de polipéptidos de DART C es (**SEQ ID NO:97**):

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY  
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
 QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYSFTSYWM  
 NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK STSTAYMELS  
 5 SLRSEDNAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTI VTVSSGGCGG GEVAACEKEV  
 AALEKEVAAL EKEVAALEKE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD  
 TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST  
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY  
 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD  
 10 SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLG

**[00219]** La segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART C comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID NO:87**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:5)**); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse CTLA-4 (VH<sub>CTLA-4</sub> de mAAb 3 de CTLA-4 de VH) (**SEQ ID NO:90**); un péptido enlazador de intervención que contiene cisteína (**Enlazador 2: GGCGGG (SEQ ID NO:6)**); un  
 15  
 20 Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:21**); y un C-término.

**[00220]** La secuencia de aminoácidos de la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART C es (**SEQ ID NO:98**):

25 EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL

LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGKTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS  
YTMHWVRQAP KGKLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL  
QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSGGC GGGKVAACKE  
5 KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

### 3. DART D

**[00221]** DART D es el diacuerpo A biespecífico que contiene  
10 la Región Fc de cuatro cadenas que tiene dos sitios de unión  
específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para  
CTLA-4, una región de Fc de IgG4 variante diseñada para  
prolongar la vida media, y Dominios Promotores de Heterodímeros  
de hélice E/K. La primera y tercera cadenas de polipéptidos de  
15 DART D comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-  
término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de  
unirse a un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID**  
**NO:87**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:**  
GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo  
20 monoclonal capaz de unirse CTLA-4 (VH<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4  
de VH) (**SEQ ID NO:90**); un péptido enlazador de intervención  
que contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un  
Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice  
E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**)); una  
25 Región de Bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO:36**); una

variante de un Dominio de CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO:81**); y un C-término.

**[00222]** La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera

5 cadenas de polipéptidos de DART D es (**SEQ ID NO:99**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS  
 YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL  
 10 QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSGGC GGGEVAACEK  
 EVAALEKEVA ALEKEVAALE KESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP  
 KDTLYITREP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN  
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKG LPSSIIEKTIS KAKGQPREPQ  
 VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV  
 15 LDSGGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLG

**[00223]** La segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART

D comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CTLA-4 (VL<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 de VL) (**SEQ ID**  
 20 **NO:91**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:**  
 GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-I de VH) (**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención que contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un  
 25 Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína

(dominio K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:21**); y un C-término.

**[00224]** La secuencia de aminoácidos de la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART D es (**SEQ ID NO:100**):

```

5      EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
      GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
      QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYSFTSYWM
      NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK STSTAYMELS
      SLRSEDNAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTI VTVSSGGCGG GKVAACKEKV
10     AALKEKVAAL KEKVAALKE

```

#### **4. DART F**

**[00225]** DART F es el diacuerpo A biespecífico que contiene la Región Fc de cuatro cadenas que tiene dos sitios de unión

15 específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para CTLA-4, una Región de Fc de IgG1 variante diseñada para reducir/eliminar la función efectora y prolongar la vida media, y los Dominios Promotores de Heterodímeros de hélice E/K. La primera y tercera cadenas de polipéptidos de DART F comprenden,

20 en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID NO:87**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1: GGGSGGGG** (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de

25 unirse CTLA-4 (VH<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 de VH) (**SEQ ID NO:90**);

un péptido enlazador de intervención que contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**)); una Región de Bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO:33**); una variante de un Dominio de CH2-CH3 de IgG1 que comprende las sustituciones L235A/L235A/M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO:80**); y un C-término.

**[00226]** La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas de polipéptidos de DART F (**SEQ ID NO:101**) es:

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGKTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS
YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL
QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSGGC GGGEVAACEK
EVAALEKEVA ALEKEVAALE KLEPKSADKT HTCPCCPAPE AAGGPSVFLF
PPKPKDTLYI TREPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SPG

```

**[00227]** La segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART F comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término, un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CTLA-4 (VL -4 de mAb 3 de CTLA-4 VL) (**SEQ ID NO:91**);

un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:** GGGSGGGG  
(**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal  
capaz de unirse a un PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-I de VH)  
(**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención que  
5 contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un  
Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice  
K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:21**); y un C-  
término.

[00228] La secuencia de aminoácidos de la segunda y cuarta  
10 cadenas de polipéptidos de DART F es la misma como aquella de  
la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART D (**SEQ ID  
NO:100**) .

**B. Diacuerpos de Cuatro Cadenas Ejemplares que contienen la**  
15 **Región de Fc que tiene los Dominios de CL/CH1: DART E**

[00229] Se generó un diacuerpo biespecífico que contenía la  
Región de Fc de cuatro cadenas de PD-1 x CTLA-4 ejemplar que  
comprendía los Dominios de CL/CH1 designados "**DART E**". La  
estructura de estos diacuerpos que contienen la Región de Fc  
20 se detalla a continuación. Este diacuerpo de PD-1 x CTLA-4  
ejemplar pretende ilustrarse, pero de ninguna manera limitar,  
el alcance de la invención.

[00230] DART E es el diacuerpo A biespecífico que contiene  
la Región Fc de cuatro cadenas que tiene dos sitios de unión  
25 específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para

CTLA-4, Dominios de CL/CH1, y una región de Fc de IgG4 variante diseñada para prolongar la vida media. La primera y tercera cadenas de polipéptidos de DART E comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término; un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CTLA-4 (VL<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 VL) (**SEQ ID NO:91**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-I de VH) (**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 2**: LGGGSG (**SEQ ID NO:8**)); un Dominio de CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO:42**); una Región de Bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 36**); una variante de un Dominio de CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO:81**); y un C-término.

**[00231]** La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas de polipéptidos de DART E es (**SEQ ID NO:102**):

```

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
QGTKVEIKGG GSGGGGQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCKA SGYSFTSYWM
NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK STSTAYMELS
SLRSED TAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGT L VTVSSLGGGS GASTKGPSVF
PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVT V SWNSGALTSG VHTFPAVLQS
SGLYSLSSV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC
PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLYITREPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV

```

DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP  
 SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV  
 EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH  
 EALHNHYTQK SLSLSLG

5 **[00232]** La segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART  
 E comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-  
 término; un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de  
 unirse a un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID**  
**NO:87**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:**  
 10 GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo  
 monoclonal capaz de unirse CTLA-4 (VH<sub>CTLA-4</sub> de mAb de CTLA-4 VH)  
 (**SEQ ID NO:90**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador**  
**2: LGGSG** (**SEQ ID NO:8**)); un Dominio de CL kappa (**SEQ ID NO:38**);  
 y un C-término.

15 **[00233]** La secuencia de aminoácidos de la segunda y cuarta  
 cadenas de polipéptidos de DART E es (**SEQ ID NO:103**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CAASGFTFSS  
 20 YTMHWVRQAP GKGLEWVTFI SYDGSNKHYA DSVKGRFTVS RDNSKNTLYL  
 QMNSLRAEDT AIYYCARTGW LGPFDYWGQG TLVTVSSLGG GSGRTVAAPS  
 VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNNFYPREA KVQWKVDNAL QSGNSQESVT  
 EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA DYEKHKVYAC EVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

25 **C. Moléculas de unión trivalente ejemplares que contienen**

### Regiones de Fc

**[00234]** Se generaron dos moléculas biespecíficas de unión trivalente que contienen la Región de Fc de cuatro cadenas de PD-1 x CTLA-4 ejemplares (designadas "**TRIDENT A**" y "**TRIDENT B**"). La estructura de estas moléculas de unión trivalente que contienen la Región de Fc se detalla a continuación. También se presenta a continuación una variante de tres cadenas designadas "**TRIDENT C**", la cual puede generarse. Estas moléculas de unión trivalente de PD-1 x CTLA-4 ejemplares pretenden ilustrar, pero de ninguna manera limitar, el alcance de la invención.

#### 1. TRIDENT A

**[00235]** TRIDENT A es una molécula biespecífica de unión trivalente que contiene la Región de Fc de cuatro cadenas que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, un sitio de unión específica para CTLA-4, una región de Fc de IgG1 variante que porta la perilla/orificio diseñada para prolongar la vida media, Dominios Promotores de Heterodímeros de hélice E/K y Dominios de CL/CH1. La primera cadena de polipéptidos de TRIDENT A comprende, en dirección N-terminal a C-terminal: un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID NO:87**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1: GGGSGGGG (SEQ ID NO:5)**); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz

de unirse a un PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-I de VH) (**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención que contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice E)  
 5 (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**)); una Región de Bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 36**); un Dominio de CH2-CH3 de IgG4 que porta la perilla que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO:84**); y un C-término.

10 **[00236]** La secuencia de aminoácidos de la primera cadena de polipéptidos de TRIDENT A es (**SEQ ID NO:104**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS  
 15 YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM  
 ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAACE  
 KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKESKYGPPC PPCPAPEFLG GPSVFLFPPK  
 PKDTLYITRE PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF  
 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP  
 20 QVYTLPPSQE EMTKNQVSLW CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP  
 VLDSDGSFLL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSLG

**[00237]** La segunda cadena de polipéptidos de TRIDENT A comprende, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término,  
 un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a  
 25 un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID NO:87**);

un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:** GGGSGGGG  
(**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal  
capaz de unirse a un PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-I de VH)  
(**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención que  
5 contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un  
Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice  
K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:21**)); y un C-  
término.

**[00238]** La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena de  
10 polipéptidos de TRIDENT A es (**SEQ ID NO:105**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
TFGGGKTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS  
YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM  
15 ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGKVAACK  
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

**[00239]** La tercera cadena de polipéptidos de TRIDENT A  
comprende, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término;  
un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse  
20 CTLA-4 (VH<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 VH) (**SEQ ID NO:90**); un  
Dominio de CH1 de IgG4 (**SEQ ID NO:42**); una Región de Bisagra  
de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 36**); un Dominio de CH2-CH3 de  
IgG4 que porta el orificio que comprende las sustituciones  
M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID**  
25 **NO:81**); y un C-término.

**[00240]** La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena de polipéptidos de TRIDENT A es (**SEQ ID NO:106**):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF  
 ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG  
 5 WLGPFDYWQO GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY  
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTKTYT  
 CNVDHKPSNT KVDKRVESKY GPCCPPCPAP EFLGGPSVFL FPPKPKDTLY  
 ITREPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV  
 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF  
 10 PSQEEMTKNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG  
 SFFFLVSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL HNRYTQKSLS LSLG

**[00241]** La cuarta cadena de polipéptidos de TRIDENT A comprende, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término; un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a  
 15 CTLA-4 (VL<sub>CTLA-4</sub> de mAb de CTLA-4 VL) (**SEQ ID NO:91**); un Dominio de CL kappa (**SEQ ID NO:38**); y un C-término.

**[00242]** La secuencia de aminoácidos de la cuarta cadena de polipéptidos de TRIDENT A es (**SEQ ID NO:107**):

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY  
 20 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG  
 QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK  
 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TLSKADYEKH KVIACEVTHQ  
 GLSSPVTKSF NRGEC

## 2. TRIDENT B

25 **[00243]** TRIDENT B es una molécula biespecífica de unión

trivalente que contiene la Región de Fc de cuatro cadenas que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, un sitio de unión específica para CTLA-4, una Región de Fc de IgG1 que porta la perilla/orificio variante diseñada para

5 reducir/eliminar la función efectora y prolongar la vida media, Dominios Promotores de Heterodímeros de hélice E/K y Dominios de CL/CH1. La primera cadena de polipéptidos de TRIDENT B comprende, en dirección N-terminal a C-terminal: un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID NO:87**); un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:** GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-I de VH) (**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención que contiene

15 cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:20**)); un enlazador (**SEQ ID NO: 31**); un Dominio de CH2-CH3 de IgG1 que porta la perilla que comprende las sustituciones

20 L234A/L235A/M252Y/S254T/ T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO:82**); y un C-término.

**[00244]** La secuencia de aminoácidos de la primera cadena de polipéptidos de TRIDENT B es (**SEQ ID NO:108**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL

25 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY

TFGGGKTKVEI KGGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYSFTS  
 YWMNWVRQAP GQGLEWIGVI HPSDSETWLD QKFKDRVTIT VDKSTSTAYM  
 ELSSLRSEDV AVYYCAREHY GTSPFAYWGQ GTLVTVSSGG CGGGEVAACE  
 KEVAALEKEV AALEKEVAAL EKGGGDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP  
 5 KPKDTLYITR EPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ  
 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE  
 PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL WCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP  
 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP  
 GK

10 **[00245]** La segunda cadena de polipéptidos de TRIDENT B  
 comprende, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término,  
 un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a  
 un PD-1 (VL<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-SQ de VL) (**SEQ ID NO:87**);  
 un péptido enlazador de intervención (**Enlazador 1:** GGGSGGGG  
 15 (**SEQ ID NO:5**)); un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal  
 capaz de unirse a un PD-1 (VH<sub>PD-1</sub> de mAb de PD-1 de 6-I de VH)  
 (**SEQ ID NO:86**); un péptido enlazador de intervención que  
 contiene cisteína (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); un  
 Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice  
 20 K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:21**)); y un C-  
 término.

**[00246]** La secuencia de aminoácidos de la segunda cadena de  
 polipéptidos de TRIDENT B es la misma como aquella de la segunda  
 cadena de polipéptidos de TRIDENT A (**SEQ ID NO:105**):

25 **[00247]** La tercera cadena de polipéptidos de TRIDENT B

comprende, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término; un Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse CTLA-4 (VH<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 de VH) (**SEQ ID NO:90**); un Dominio de CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO:40**); una Región de Bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO:33**); un Dominio de CH2-CH3 de IgG1 que porta el orificio que comprende las sustituciones L234A/L235A/M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO:83**); y un C-término.

**[00248]** La secuencia de aminoácidos de la tercera cadena de polipéptidos de TRIDENT B es (**SEQ ID NO:109**):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYTMHWVRQA PGKGLEWVTF  
 ISYDGSNKHY ADSVKGRFTV SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAIYYCARTG  
 WLGPFDYWQO GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY  
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI  
 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD  
 TLYITREPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST  
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY  
 TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD  
 SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK

**[00249]** La cuarta cadena de polipéptidos de TRIDENT B comprende, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término; un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CTLA-4 (VL<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 VL) (**SEQ ID NO:91**); un Dominio de CL kappa (**SEQ ID NO:38**); y un C-término.

**[00250]** La secuencia de aminoácidos de la cuarta cadena de

polipéptidos de TRIDENT B es la misma como aquella de la segunda cadena de polipéptidos de TRIDENT A (**SEQ ID NO:107**).

### 3. TRIDENT C

5 **[00251]** Como se proporciona en la presente, las moléculas de unión trivalente que comprenden tres cadenas de polipéptidos puede generarse al combinar (*por ejemplo, fusionando polinucleótidos de codificación, etc.*) los dominios de unión de dos cadenas de polipéptidos separadas en una cadena. Una  
10 molécula biespecífica de unión trivalente que contiene la Región de Fc de tres cadenas que puede generarse tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, un sitio de unión específica para CTLA-4, una región de Fc de IgG1 variante que porta la perilla/orificio diseñada para prolongar la vida  
15 media, y Dominios Promotores de Heterodímeros de hélice E/K ("**TRIDENT C**"). La primera y segunda cadenas de polipéptidos de TRIDENT C pueden ser idénticas a aquellos de TRIDENT A proporcionados en lo anterior.

**[00252]** Cuando la primera y segunda cadenas son idénticas a  
20 aquellas de TRIDENT A, la tercera cadena de polipéptidos de TRIDENT C puede comprender, en dirección N-terminal a C-terminal: un N-término; un Dominio de VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a CTLA-4 (VL<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 VL) (**SEQ ID NO:91**); un péptido separador de intervención  
25 (GGGGSGGGSGGGGS (**SEQ ID NO:37**)); un Dominio de VH de un

anticuerpo monoclonal capaz de unirse CTLA-4 (VH<sub>CTLA-4</sub> de mAb 3 de CTLA-4 VH) (**SEQ ID NO:90**); una Región de Bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO: 36**); un Dominio de CH2-CH3 de IgG4 que porta el orificio que comprende las sustituciones  
 5 M252Y/S254T/T256E y carece del residuo C-terminal (**SEQ ID NO:85**); y un C-término.

**[00253]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la tercera cadena de polipéptidos de TRIDENT C es (**SEQ ID NO:110**):

```

    EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSFLAWYQQK PGQAPRLLIY
10  GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG
    QGTKVEIKGG GSGGGGSGG GGSQVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCAASGF
    TFSSYTMHWV RQAPGKGLEW VTFISYDGSN KHYADSVKGR FTVSRDNSKN
    TLYLQMNSLR AEDTAIYYCA RTGWLGPFDY WGQGLVTVS SESKYGPPCP
    PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP KDTLYITREP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW
15  YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG
    LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI
    AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLV SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV
    MHEALHNRYT QKSLSLSLG
  
```

## 20 **IX. Métodos de Producción**

**[00254]** Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención se producen de mayor preferencia a través de la expresión recombinante de moléculas de ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, como se conoce bien en la  
 25 técnica.

- [00255]** Los polipéptidos de la invención pueden prepararse de forma conveniente utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, B. (1986) "*Solid Phase Synthesis*", Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "*General Method For*  
 5 *The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Eespecificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*", Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).
- 10 **[00256]** En una alternativa, los anticuerpos pueden elaborarse de forma recombinante y expresarse utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos pueden elaborarse de forma recombinante al aislar primero los anticuerpos hechos de animales huésped, que obtienen la secuencia génica, y utilizan  
 15 la secuencia génica para expresar el anticuerpo de forma recombinante en las células huésped (por ejemplo, células de CHO). Otro método que puede emplearse es expresar la secuencia de anticuerpos en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito métodos adecuados para expresar  
 20 anticuerpos de forma recombinante en plantas o leche (véase, por ejemplo, Peeters et al. (2001) "*Production Of Antibodies and Antibody Fragments In Plants*", Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "*Human Antibodies From Transgenic Mice*", Int. Rev. Immunol 13:65-93; y Pollock et al. (1999) "*Transgenic Milk*  
 25 *As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*", J.

Immunol Methods 231:147-157). Tales métodos para elaborar derivados de anticuerpos, *por ejemplo*, se conocen en la técnica humanizados, de una sola cadena, *etc.*, y se ha descrito en lo anterior. En otra alternativa, los anticuerpos pueden  
5 elaborarse de forma recombinante por tecnología de despliegue de fagos (véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos No. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; y Winter, G. *et al.* (1994) "*Making Antibodies By Phage Display Technology*", Annu. Rev. Immunol. 12:433-455).

10 **[00257]** Los vectores que contienen los polinucleótidos de interés (*por ejemplo*, polinucleótidos que codifican las cadenas de polipéptidos de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención) pueden introducirse en la célula huésped por cualquiera de un número de medios apropiados,  
15 incluyendo electroporación, transfección que emplea cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrán, u otras sustancias; bombardeo por microproyectiles; lipofección; e infección (*por ejemplo*, cuando el vector es un agente infeccioso tal como el virus vacua). La elección de introducir  
20 vectores o polinucleótidos a menudo dependerá de las características de la célula huésped.

**[00258]** Cualquier célula huésped capaz de sobreexpresar ADN heterólogo puede utilizarse para el propósito de expresar un polipéptido o proteína de interés. Ejemplos no limitantes de  
25 células huésped de mamíferos adecuados incluyen pero no se

limitan a células COS, HeLa, y CHO.

**[00259]** La invención incluye polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 de esta invención. Los polipéptidos de esta invención  
5 pueden hacerse por procedimientos conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden producirse por degradación proteolítica u otra de los anticuerpos, por métodos recombinantes (*es decir*, polipéptidos simples o de fusión) como se describe en lo anterior o por síntesis química. Los polipéptidos de los  
10 anticuerpos, especialmente polipéptidos más cortos de hasta alrededor de 50 aminoácidos, se elaboran de forma conveniente por síntesis química. Los métodos de síntesis química se conocen en la técnica y se encuentran comercialmente disponibles.

**[00260]** La invención incluye variantes de moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4, que incluyen los polipéptidos funcionalmente equivalentes que no afectan significativamente las propiedades de tales moléculas así como variantes que tienen una actividad intensificada o reducida. La modificación  
20 de polipéptidos es una práctica de rutina en la técnica y no necesitan describirse en detalle en la presente. Ejemplos de polipéptidos modificados incluyen polipéptidos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos, una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no deterioran  
25 significativamente el cambio de la actividad funcional, o uso

de análogos químicos. Los residuos de aminoácidos que pueden sustituirse de forma conservadora entre sí incluyen pero no se limitan a: glicina/alanina; serina/treonina; valina/isoleucina/leucina; asparagina/glutamina; ácido aspártico/ácido glutámico; lisina/arginina; y fenilalanina/tirosina. Estos polipéptidos también incluyen polipéptidos glicosilados y no glicosilados, así como polipéptidos con otras modificaciones post-traductorales, tales como, por ejemplo, glicosilación con azúcares diferentes, acetilación, y fosforilación. De preferencia, las sustituciones de aminoácidos pueden ser conservadoras, es decir, los aminoácidos sustituidos pueden poseer propiedades químicas similares como aquellos de los aminoácidos originales. Tales sustituciones conservadoras se conocen en la técnica, y se han proporcionado ejemplos en lo anterior. Las modificaciones de aminoácidos pueden oscilar desde cambiar o modificar uno o más aminoácidos hasta completar el rediseño de una región, tal como el Dominio Variable. Los cambios en el Dominio Variable pueden alterar la afinidad de unión y/o especificidad. Otros métodos de modificación incluyen utilizar técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, medios enzimáticos, sustitución oxidativa y quelación. Las modificaciones pueden utilizarse, por ejemplo, para la unión de etiquetas para inmunoanálisis, tal como la unión de porciones radioactivas para

radioinmunoanálisis. Los polipéptidos modificados se elaboran utilizando procedimientos establecidos en la técnica y pueden seleccionarse utilizando ensayos estándar conocidos en la técnica.

5   **[00261]**   La invención abarca proteínas de fusión que comprenden uno o más del polipéptidos o anticuerpos de esta invención. En una modalidad, se proporciona un polipéptido de fusión que comprende una cadena ligera, una cadena pesada o tanto una cadena pesada como una ligera. En otra modalidad, el  
10   polipéptido de fusión contiene una región constante de inmunoglobulina heteróloga. En otra modalidad, el polipéptido de fusión contiene un Dominio Variable de Cadena Ligera y un Dominio Variable de Cadena Pesada de un anticuerpo producido a partir de un hibridoma depositado públicamente. Para propósitos  
15   de esta invención, una proteína de fusión al anticuerpo contiene uno o más dominios de polipéptidos que se unen específicamente a un PD-1 y/o CTLA-4 y otra secuencia de aminoácidos a la cual no se une en la molécula nativa, por ejemplo, una secuencia heteróloga o una secuencia homóloga de  
20   otra región.

**X.    Usos de las Moléculas Biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la Presente Invención**

25   **[00262]**   La presente invención abarca composiciones que

incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos biespecíficos, las moléculas de unión trivalente, *etc.*),  
5 polipéptidos derivados de tales moléculas, polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican tales moléculas o polipéptidos, y otros agentes como se describe en la presente.

**[00263]** Como se discute en lo anterior, ambos de PD-1 y CTLA-4 juegan papeles importantes en las respuestas inmunes que se  
10 regulan de forma negativa (*por ejemplo*, proliferación, función y homeostasis de células inmunes). Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención tienen la capacidad de inhibir la función de PD-1, y de este modo invertir la inhibición del sistema inmune mediado por PD-1. Además, las  
15 moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención tienen la capacidad de inhibir la función de CTLA-4 y de este modo aumentan el sistema inmune al bloquear la inhibición del sistema mediado por PD-1 y CTLA-4. Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención también  
20 permiten el bloqueo completo de PD-1 y CTLA-4, así como el bloqueo que se sesga hacia CTLA-4 cuando se coexpresa con PD-1. De este modo, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención son útiles para aliviar el agotamiento de las células T y/o aumento de una respuesta inmune (*por ejemplo*,  
25 una respuesta inmune mediada por células T y/o células NK) de

un sujeto. En particular, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención pueden utilizarse para tratar cualquier enfermedad o padecimiento asociado con un sistema inmune suprimido indeseable, incluyendo cáncer y enfermedades  
5 que se asocian con la presencia de un patógeno (*por ejemplo*, una infección bacteriana, hongo, viral o protozoario).

**[00264]** Los cánceres que pueden tratarse por las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención incluyen cánceres caracterizados por la presencia de una célula  
10 de cáncer seleccionada del grupo que consiste de una célula de: un tumor de glándulas adrenales, un cáncer asociado con SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandos, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor metastásico de cerebro, un  
15 cáncer de mama, un tumor en el cuerpo de la carótida, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma cromóforo de células renales, un carcinoma de células transparentes, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma cutáneo fibroso benigno, un tumor desmoplásico de células redondas  
20 pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ostium de fibrogénesis imperfecta, una displasia fibrosa del hueso, un cáncer de vesícula biliar o ducto biliar, cáncer gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional, un tumor de células germinales, un  
25 cáncer de cabeza y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor

en las células de islote, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón, un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una neoplasia endócrina múltiple, un mieloma múltiple, un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma, tumores neuroendócrinos, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, un carcinoma papilar de tiroides, un tumor en paratiroides, un cáncer pediátrico, un tumor periférico en las vainas nerviosas, un feocromocitoma, un tumor de pituitaria, un cáncer de próstata, un melanoma uveal posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer metastásico renal, un tumor rabdoide, un rhabdomyosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un sarcoma de tejido blando, un cáncer de células escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico, un timoma, un cáncer metastásico de tiroides, y un cáncer uterino.

**[00265]** En particular, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento de cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioma, cáncer de riñón, cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, neuroblastoma; sarcoma, linfoma de no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer rectal.

**[00266]** Las infecciones que pueden tratarse por las moléculas

biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención  
 incluyen infecciones crónicas virales, bacterianas, por hongos  
 y parásitos. Las infecciones crónicas que pueden tratarse por  
 las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente  
 5 invención incluyen el virus de Epstein Barr, Virus de la  
 Hepatitis A (HAV); Virus de la Hepatitis B (VHB); Virus de la  
 Hepatitis C (VHC); virus de herpes (*por ejemplo* HSV-1, HSV-2,  
 HHV-6, CMV), Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de  
 Estomatitis Vesicular (VSV), *Bacilli*, *Citrobacter*, *Cholera*,  
 10 *Diphtheria*, *Enterobacter*, *Gonococci*, *Helicobacter pylori*,  
*Klebsiella*, *Legionella*, *Meningococci*, *mycobacteria*,  
*Pseudomonas*, *Pneumonococci*, bacterias de ricketsia,  
*Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Tetanus*,  
*Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, etc.), *Blastomyces*  
 15 *dermatitidis*, *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C.*  
*tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, Género *Mucorales*  
*(mucor, absidia, rhizopus)*, *Sporothrix schenkii*,  
*Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis*,  
*Histoplasma capsulatum*, *Leptospirosis*, *Borrelia burgdorferi*,  
 20 helmintos parásitos (*anquilostoma*, *solitarias*, *tremátodos*,  
*lombrices planas* (*por ejemplo Schistosomia*), *Giardia lamblia*,  
*trichinella*, *Dientamoeba Fragilis*, *Trypanosoma brucei*,  
*Trypanosoma cruzi*, y *Leishmania donovani*.

## 25 **XI. Composiciones Farmacéuticas**

**[00267]** Las composiciones de la invención incluyen composiciones de fármaco por volumen útiles en la fabricación de composiciones farmacéuticas (*por ejemplo*, composiciones impuras o no estériles) y composiciones farmacéuticas (es  
5 *decir*, composiciones que son adecuadas para su administración a un sujeto o paciente) que pueden utilizarse en la preparación de formas de dosificación unitaria. Tales composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la  
10 presente invención, o una combinación de tales agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. De preferencia, las composiciones de la invención comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención y un  
15 portador farmacéuticamente aceptable. La invención también abarca tales composiciones farmacéuticas que incluyen adicionalmente un segundo anticuerpo terapéutico (*por ejemplo*, anticuerpo monoclonal específico de tumor) que son específicas para un antígeno de cáncer particular, y un portador  
20 farmacéuticamente aceptable.

**[00268]** En una modalidad específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconoce  
25 generalmente para su uso en animales, y más en particular en

humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante (*por ejemplo*, adyuvante de Freund (completo e incompleto), excipiente, o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la invención se suministran cualquiera de la forma de dosificación unitaria por separado o mezclada junto con la forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampula o sobre  
5  
10 indicando la cantidad del agente activo. Cuando la composición debe administrarse por infusión, puede distribuirse con una botella de infusión que contenga solución salina o agua de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampula de agua o  
15 solución salina estéril para inyección de modo que los ingredientes pueden mezclarse antes de su administración.

**[00269]** La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes cargados con una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 de la presente  
20 invención, sola o con tal portador farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, uno o más agentes terapéuticos o profilácticos diferentes útiles para el tratamiento de una enfermedad también pueden incluirse en el paquete o kit farmacéutico. La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende  
25 uno o más recipientes cargados con uno o más de los ingredientes

de las composiciones farmacéuticas de la invención. Se asocian opcionalmente con tales recipientes que pueden ser un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para su administración en humanos.

[00270] La presente invención proporciona kits que pueden utilizarse en los métodos anteriores. Un kit puede comprender cualquiera de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención. El kit además puede comprender uno o más agentes profilácticos y/o terapéuticos diferentes útiles para el tratamiento de cáncer, en uno o más recipientes.

## **XII. Métodos de Administración**

[00271] Las composiciones de la presente invención pueden proporcionarse para el tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección al administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención, o una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión o una molécula conjugada de la invención. En un aspecto preferido, tales composiciones se purifican sustancialmente (es decir, sustancialmente libres de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios indeseados). En una modalidad específica, el sujeto es un

animal, de preferencia un mamífero tal como un no primate (*por ejemplo, bovino, equino, felino, canino, roedor, etc.*) o un primate (*por ejemplo, monos tales como, un mono cynomolgus, humano, etc.*). En una modalidad preferida, el sujeto es un humano.

**[00272]** Diversos sistemas de suministro se conocen y pueden utilizarse para administrar las composiciones de la invención, *por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el* anticuerpo o proteína de fusión, endocitosis mediada por anticuerpos (Véase, *por ejemplo, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated in Vitro Gene Transformation by a Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432*), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, *etc.*

**[00273]** Los métodos para administrar una molécula de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (*por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea*), epidural, y mucosal (*por ejemplo, vías intranasal y oral*). En una modalidad específica, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención se administrarán de forma intramuscular, intravenosa, o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, *por ejemplo, por* infusión o inyección de bolo, *por absorción a través de los*

revestimientos epitelial o mucocutáneos (*por ejemplo*, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, *etc.*) y pueden administrarse juntos con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también  
5 puede emplearse la administración pulmonar, *por ejemplo*, por el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente en aerosol. Véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos No. 6,019,968; 5,985, 320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; y 4,880,078; y Publicaciones  
10 PCT Nos. WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; y WO 99/66903, cada una de las cuales se incorpora en la presente para su referencia en su totalidad.

**[00274]** La invención también proporciona que las preparaciones de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4  
15 de la presente invención se empacan en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampula o sobre que indica la cantidad de la molécula. En una modalidad, tales moléculas se suministran como un polvo liofilizado esterilizado en seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente  
20 sellado y puede reconstituirse, *por ejemplo*, con agua o solución salina a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. De preferencia, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención se suministran como un polvo liofilizado estéril en seco en un  
25 recipiente herméticamente sellado.

[00275] Las preparaciones liofilizadas de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención deben almacenarse entre 2°C y 8°C en su recipiente original y las moléculas deben administrarse a las 12 horas, de preferencia a  
5 las 6 horas, a las 5 horas, a las 3 horas, o a la hora después de reconstituirse. En una modalidad alternativa, tales moléculas se suministran en forma líquida en un recipiente herméticamente sellado que indique la cantidad y concentración de la molécula, proteína de fusión, o molécula conjugada. De  
10 preferencia, cuando se proporcionan tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 en forma líquida se suministran en un recipiente herméticamente sellado.

[00276] La cantidad de tales preparaciones de la invención que serán efectivas en el tratamiento, prevención o mejora de  
15 uno o más síntomas asociados con un trastorno podrán determinarse por técnicas clínicas estándar. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la seriedad del padecimiento, y deberá decidirse de acuerdo con el juicio del profesional y cada  
20 circunstancia del paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas in vitro o sistemas de prueba en modelos animales.

[00277] Como se utiliza en la presente, una **"cantidad efectiva"** de una composición farmacéutica, en una modalidad,  
25 es una cantidad suficiente para efectuar los resultados

benéficos o deseados que incluyen, sin limitación, los resultados clínicos tales como reducir los síntomas que resultan de la enfermedad, atenuar un síntoma de infección (*por ejemplo, carga viral, fiebre, dolor, sepsis, etc.*) o un síntoma  
5 de cáncer (*por ejemplo, la proliferación de células de cáncer, presencia de tumor, metástasis de tumor, etc.*), incrementando de este modo la calidad de vida de aquellos que padecen de la enfermedad, reduciendo la dosis de otros medicamentos requeridos para tratar la enfermedad, intensificar el efecto  
10 de otro medicamento tal como mediante la dirección y/o internalización, retrasar el avance de la enfermedad, y/o prolongar la supervivencia de los individuos.

**[00278]** Una cantidad efectiva puede administrarse en una o más administraciones. Para propósitos de esta invención, una  
15 cantidad efectiva de fármaco, compuesto, o composición farmacéutica es una cantidad suficiente: para exterminar y/o reducir la proliferación de células de cáncer, y/o eliminar, reducir y/o retardar el desarrollo de metástasis a partir de un sitio primario de cáncer; o para reducir la proliferación  
20 de (o el efecto of) un patógeno infeccioso y reducir y/o retardar el desarrollo de la enfermedad mediada por el patógeno, ya sea directa o indirectamente. En algunas modalidades, puede o no puede obtenerse una cantidad efectiva de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica junto con  
25 otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. De este

modo, puede considerarse una "cantidad efectiva" en el contexto de administrar uno o más agentes quimioterapéuticos, y puede considerarse u solo agente para darse en una cantidad efectiva si junto con uno o más agentes diferentes, puede o se obtiene  
5 un resultado deseable. Mientras que varían las necesidades individuales, la determinación de los márgenes óptimos de cantidades efectivas de cada componente se encuentra dentro de la experiencia de la técnica.

**[00279]** Para las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4  
10 abarcadas por la invención, la dosificación administrada a un paciente se determina de preferencia con base en el peso corporal (kg) del sujeto receptor. Para las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 abarcadas por la invención, la dosificación administrada a un paciente es típicamente de  
15 alrededor de 0.01 µg/kg a alrededor de 150 mg/kg o más del peso corporal del sujeto.

**[00280]** La osificación y frecuencia de administración de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención pueden reducirse o alterarse al intensificar la captación y  
20 penetración de tejidos de la molécula por modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

**[00281]** La dosificación de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 de la invención administrada a un paciente puede calcularse para su uso como terapia de un solo agente.  
25 Alternativamente, la molécula puede utilizarse en combinación

con otras composiciones terapéuticas y la dosificación administrada a un paciente son menores que cuando las moléculas se utilizan como terapia de un solo agente.

**[00282]** Las composiciones farmacéuticas de la invención  
5 pueden administrarse de forma local en el área en necesidad de  
tratamiento; esto puede obtenerse por ejemplo, y no a manera  
de limitación, por infusión local, por inyección, o por medio  
de un implante, el implante siendo de un material poroso, no  
poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas  
10 sialásticas, o fibras. De preferencia, cuando se administra  
una molécula de la invención, debe tenerse cuidado para  
utilizar materiales en los cuales la molécula o se absorbe.

**[00283]** Las composiciones de la invención pueden  
suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (Véase  
15 Langer (1990) "*New Methods Of Drug Delivery*", Science 249:1527-  
1533); Treat et al., en LIPOSOMES IN THE THERAPY OF INFECTIOUS DISEASE  
AND CANCER, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York,  
pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327).

**[00284]** Cuando la composición de la invención es un ácido  
20 nucleico que codifica una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-  
4 de la presente invención, el ácido nucleico puede  
administrarse *in vivo* para promover la expresión de su molécula  
biespecífica de PD-1 x CTLA-4 codificada al construirla como  
parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiados  
25 y administrarlo de modo que se vuelva intracelular, por

*ejemplo*, por el uso de un vector retroviral vector (Véase Patente de los Estados Unidos No. 4,980,286), o por inyección directa, o por el uso de bombardeo con micropartículas (*por ejemplo*, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o

5 recubrimiento con receptores de lípidos o superficie celular o agentes de transfección, o al administrarla en un enlace para un péptido similar a homeobloque que se conoce para ingresar el núcleo (Véase *por ejemplo*, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural

10 *Morphogenesis*", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868), etc. Alternativamente, puede introducirse de forma intracelular un ácido nucleico e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para su expresión por recombinación homóloga.

15 **[00285]** El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención puede incluir un solo tratamiento o de preferencia, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto

20 se trata con tal diacuerpo una vez a la semana por entre alrededor de 1 a 10 semanas, de preferencia entre 2 a 8 semanas, de mayor preferencia entre alrededor de 3 a 7 semanas, e incluso de mayor preferencia por alrededor de 4, 5, o 6 semanas. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden

25 administrarse una vez al día, dos veces al día, o tres veces

al día. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. También se apreciará que la dosificación efectiva de las moléculas utilizadas para tratamiento puede incrementarse o reducirse durante el transcurso de un tratamiento particular.

#### **I. Modalidades Ejemplares**

10 **[00286]** La invención se dirige en particular a las modalidades E1-E26:

E1. Una molécula biespecífica que posee uno o más sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a (un) epítipo(s) de PD-1 y uno o más sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a (un) epítipo(s) de CTLA-4, en donde tal molécula comprende:

20 (A) un Dominio Variable de Cadena Pesada y un Dominio Variable de Cadena Ligera de un anticuerpo que une PD-1; y

(B) un Dominio Variable de Cadena Pesada y un Dominio Variable de Cadena Ligera de un anticuerpo que une CTLA-4;

en donde tal molécula es:

25 (i) un diacuerpo, tal diacuerpo siendo un complejo

- enlazado de forma covalente que comprende dos, tres, cuatro o cinco cadenas de polipéptidos; o (ii) una molécula de unión trivalente, tal molécula de unión trivalente siendo un complejo enlazado de forma covalente que comprende tres, cuatro, cinco o más cadenas de polipéptidos.
- 5
- E2. La molécula biespecífica de la Modalidad E1, en donde tal molécula muestra una actividad que se intensifica en relación con tal actividad mostrada por dos moléculas monoespecíficas una de las cuales posee tal Dominio Variable de Cadena Pesada y tal Dominio Variable de Cadena Ligera de tal anticuerpo que une PD-1 y la otra de las cuales posee tal Dominio Variable de Cadena Pesada y tal Dominio Variable de Cadena Ligera de tal anticuerpo que une CTLA-4.
- 10
- 15
- E3. La molécula biespecífica de la Modalidad E1 o E2, en donde tal molécula obtiene pocos eventos adversos inmunes relacionados (irAE) cuando se administran a un sujeto en necesidad del mismo en relación con tales iRE obtenidos por la administración de un anticuerpo monoespecífico que une CTLA-4.
- 20
- E4. La molécula biespecífica de la Modalidad E3, en donde el anticuerpo monoespecífico que une CTLA-4 es Ipilimumab.
- 25
- E5. La molécula biespecífica de cualquiera de las

Modalidades E1-E4, en donde tal molécula comprende una Región de Fc.

5 E6. La molécula biespecífica de la Modalidad E5, en donde tal Región de Fc es una Región de Fc variante que comprende:

(A) una o más modificaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la Región de Fc variante para una FcγR; y/o

10 (B) una o más modificaciones de aminoácidos que intensifican la vida media en suero de la Región Fc variante.

E7. La molécula biespecífica de la Modalidad E6, en donde tales modificaciones que reducen la afinidad de la Región de Fc variante para una FcγR comprenden la  
15 sustitución de L234A; L235A; o L234A y L235A, en donde tal numeración es aquella del índice EU como en Kabat.

E8. La molécula biespecífica de la Modalidad E6 o E7, en donde tales modificaciones que intensifican la vida  
20 media en suero de la Región de Fc variante comprende la sustitución de M252Y; M252Y y S254T; M252Y y T256E; M252Y, S254T y T256E; o K288D y H435K, en donde tal numeración es aquella del índice EU como en Kabat.

25 E9. La molécula biespecífica de cualquiera de las

- Modalidades E1-E8, en donde tal molécula es tal diacuerpo y comprende dos sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de PD-1 y dos sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de CTLA-4.
- 5 E10. La molécula biespecífica de cualquiera de las Modalidades E1-E8, en donde tal molécula es tal molécula de unión trivalente y comprende dos sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de PD-1 y un sitio de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de CTLA-4.
- 10 E11. La molécula biespecífica de cualquiera de las Modalidades E1-E10, en donde tal molécula es capaz de unirse a las moléculas de PD-1 y CTLA-4 presentes en la superficie celular.
- 15 E12. La molécula biespecífica de cualquiera de las Modalidades E1-E11, en donde tal molécula es capaz de unirse de forma simultánea un PD-1 y CTLA-4.
- 20 E13. La molécula biespecífica de cualquiera de las Modalidades E1-E12, en donde tal molécula promueve la estimulación de células inmunes.
- E14. La molécula biespecífica de la Modalidad E13, en donde tal estimulación de células inmunes resulta en:
- 25

- (A) proliferación de células inmunes; y/o
- (B) producción y/o liberación de células inmunes de  
al menos una citocina; y/o
- (C) producción y/o liberación de células inmunes de  
5 al menos una molécula lítica; y/o
- (D) expresión de células inmunes de al menos un  
marcador de activación.
- E15. La molécula biespecífica de la Modalidad E13 o E14,  
en donde tales células inmunes son linfocitos T o  
10 una célula NK.
- E16. La molécula biespecífica de cualquiera de las  
Modalidades E1-E15, en donde tales sitios de unión  
al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un  
epítipo de PD-1 comprende:
- 15 (A) el Dominio de VH de mAb 1 de PD-1 (**SEQ ID NO:47**)  
y el Dominio de VL de mAb 1 de PD-1 (**SEQ ID**  
**NO:48**); o
- (B) el Dominio de VH de mAb 2 de PD-1 (**SEQ ID NO:49**)  
y el Dominio de VL de mAb 2 de PD-1 (**SEQ ID**  
20 **NO:50**); o
- (C) el Dominio de VH de mAb 3 de PD-1 (**SEQ ID NO:51**)  
y el Dominio de VL de mAb 3 de PD-1 (**SEQ ID**  
**NO:52**); o
- (D) el Dominio de VH de mAb 4 de PD-1 (**SEQ ID NO:53**)  
25 y el Dominio de VL de mAb 4 de PD-1 (**SEQ ID**

**NO:54); o**

(E) el Dominio de VH de mAb 5 de PD-1 (**SEQ ID NO:55**)  
y el Dominio de VL de mAb 5 de PD-1 (**SEQ ID**  
**NO:56); o**

5 (F) el Dominio de VH de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:57**)  
y el Dominio de VL de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID**  
**NO:58); o**

(G) el Dominio de VH de mAb 6-I de PD-1 de VH (**SEQ**  
**ID NO:86**) y el Dominio de VL de mAb 6-SQ de PD-  
10 1 de VL (**SEQ ID NO:87); o**

(H) el Dominio de VH de mAb 7 de PD-1 (**SEQ ID NO:59**)  
y el Dominio de VL de mAb 7 de PD-1 (**SEQ ID**  
**NO:60); o**

(I) el Dominio de VH de mAb 8 de PD-1 (**SEQ ID NO:61**)  
15 y el Dominio de VL de mAb 8 de PD-1 (**SEQ ID**  
**NO:62).**

E17. La molécula biespecífica de cualquiera de las  
Modalidades E1-E16, en donde tal sitio de unión a  
los epítomos capaces de unión inmuno-específica a un  
20 epítomo de CTLA-4 comprenden:

(A) el Dominio de VH de mAb 1 de CTLA-4 (**SEQ ID**  
**NO:76**) y el Dominio de VL de mAb 1 de CTLA-4  
(**SEQ ID NO:77); o**

(B) el Dominio de VH de mAb 2 de CTLA-4 (**SEQ ID**  
25 **NO:78**) y el Dominio de VL de mAb 2 de CTLA-4

(SEQ ID NO:79); o

(C) el Dominio de VH de mAb 3 de CTLA-4 (SEQ ID NO:90) y el Dominio de VL de mAb 3 de CTLA-4 (SEQ ID NO:91).

5 E18. La molécula biespecífica de la Modalidad 17, en donde:

(A) tales sitios de unión al epítipo capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de PD-1 comprenden el Dominio de VH de mAb 6-I de PD-1 de VH (SEQ ID NO:86) y el Dominio de VL de mAb 6-SQ de PD-1 (SEQ ID NO:87); y

(B) tal sitio de unión a los epítopos capaces de unión inmuno-específica a un epítipo de CTLA-4 comprenden el Dominio de VH de mAb 3 de CTLA-4 (SEQ ID NO:90) y el Dominio de VL de mAb 3 de CTLA-4 (SEQ ID NO:91).

E19. La molécula biespecífica de cualquiera de las Modalidades E1-E18, en donde tal molécula comprende:

(A) dos cadenas de polipéptidos que tienen SEQ ID NO:95, y dos cadenas de polipéptidos que tienen SEQ ID NO:96; o

(B) dos cadenas de polipéptidos que tienen SEQ ID NO:97, y dos cadenas de polipéptidos que tienen SEQ ID NO:98; o

25 (C) dos cadenas de polipéptidos que tienen SEQ ID

- NO:99**, y dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:100**; o
- (D) dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:102**, y dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:103**; o
- (E) dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:101**, y dos cadenas de polipéptidos que tienen **SEQ ID NO:100**; o
- (F) una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:104**, una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:105**, una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:106**, y una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:107**; o
- (G) una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:108**, una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:105**, una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:109**, y una cadena de polipéptidos que tiene **SEQ ID NO:107**.
- E20. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de la molécula biespecífica de cualquiera de las Modalidades E1-E19 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- E21. La molécula biespecífica de cualquiera de las Modalidades E1-E19, en donde se utiliza tal molécula para promover la estimulación de una respuesta inmune

mediada de un sujeto en necesidad de la misma.

- E22. La molécula biespecífica de cualquiera de las Modalidades E1-E19, en donde se utiliza tal molécula en el tratamiento de una enfermedad o padecimiento asociado con un sistema inmune suprimido.
- E23. La molécula biespecífica de la Modalidad E22, en donde tal enfermedad o padecimiento es cáncer o una infección.
- E24. La molécula biespecífica de la Modalidad E23, en donde tal cáncer se caracteriza por la presencia de una célula de cáncer seleccionada del grupo que consiste de una célula de: un tumor de glándulas adrenales, un cáncer asociado con SIDA, un sarcoma alveolar de partes blandos, un tumor astrocítico, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, un cáncer de cerebro y médula espinal, un tumor metastásico de cerebro, un cáncer de mama, un tumor en el cuerpo de la carótida, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un cordoma, un carcinoma cromóforo de células renales, un carcinoma de células transparentes, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un histiocitoma cutáneo fibroso benigno, un tumor desmoplásico de células redondas pequeñas, un ependimoma, un tumor de Ewing, un condrosarcoma mixoide extraesquelético, un ostium de fibrogénesis

imperfecta, una displasia fibrosa del hueso, un  
cáncer de vesícula biliar o ducto biliar, cáncer  
gástrico, una enfermedad trofoblástica gestacional,  
un tumor de células germinales, un cáncer de cabeza  
5 y cuello, carcinoma hepatocelular, un tumor en las  
células de islote, un Sarcoma de Kaposi, un cáncer  
de riñón, una leucemia, un lipoma/tumor lipomatoso  
benigno, un liposarcoma/tumor lipomatoso maligno, un  
cáncer de hígado, un linfoma, un cáncer de pulmón,  
10 un meduloblastoma, un melanoma, un meningioma, una  
neoplasia endócrina múltiple, un mieloma múltiple,  
un síndrome mielodisplásico, un neuroblastoma,  
tumores neuroendócrinos, un cáncer de ovario, un  
cáncer pancreático, un carcinoma papilar de  
15 tiroides, un tumor en paratiroides, un cáncer  
pediátrico, un tumor periférico en las vainas  
nerviosas, un feocromocitoma, un tumor de  
pituitaria, un cáncer de próstata, un melanoma uveal  
posterior, un trastorno hematológico raro, un cáncer  
20 metastásico renal, un tumor rabdoide, un  
rabdomiosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un  
sarcoma de tejido blando, un cáncer de células  
escamosas, un cáncer de estómago, un sarcoma  
sinovial, un cáncer testicular, un carcinoma tímico,  
25 un timoma, un cáncer metastásico de tiroides, y un

cáncer uterino.

- E25. La molécula biespecífica de la Modalidad E24, en donde tal infección se caracteriza por la presencia de una bacteria, hongo, patógeno viral o protozoario.
- 5 E26. La molécula biespecífica de la Modalidad E25, en donde tal infección se caracteriza por la presencia del virus de Epstein Barr, Virus de la Hepatitis A (HAV); Virus de la Hepatitis B (VHB); Virus de la Hepatitis C (VHC); virus de herpes (*por ejemplo* HSV-1, HSV-2, HHV-6, CMV), Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de Estomatitis Vesicular (VSV),
- 10 *Bacilli, Citrobacter, Cholera, Diphtheria, Enterobacter, Gonococci, Helicobacter pylori, Klebsiella, Legionella, Meningococci, mycobacteria, Pseudomonas, Pneumonococci, bacterias de ricketsia, Salmonella, Serratia, Staphylococci, Streptococci, Tetanus, Aspergillus (A. fumigatus, A. niger, etc.), Blastomyces dermatitidis, Candida (C. albicans, C. krusei, C. glabrata, C. tropicalis, etc.),*
- 15 *Cryptococcus neoformans, Género Mucorales (mucor, absidia, rhizopus), Sporothrix schenkii, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Leptospirosis, Borrelia burgdorferi, helmintos parásitos (anquilostoma,*
- 20 *solitarias, tremátodos, lombrices planas (por*
- 25

*ejemplo Schistosomia), Giardia lamblia, trichinella, Dientamoeba Fragilis, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, y Leishmania donovani.*

## 5 EJEMPLOS

[00287] Habiendo ahora descrito en general la invención, lo mismo se entenderá más fácilmente a través de la referencia a los siguientes Ejemplos. Los siguientes ejemplos ilustran diversos métodos para las composiciones en el diagnóstico o  
10 métodos de tratamiento de la invención. Los ejemplos pretenden ilustrar, pero de ninguna manera limitar, el alcance de la invención.

### Ejemplo 1

#### 15 **Moléculas Biespecíficas Proporciona la Estimulación Intensificada de Respuestas Inmunes**

[00288] Una molécula biespecífica que tiene especificidad para las proteínas de superficie celular distintas que modulan dos rutas inmunomoduladoras, PD-1 y LAG-3, se generaron y  
20 designaron **"DART A."**

[00289] DART A es un diacuerpo biespecífico que contiene la Región de Fc de cuatro cadenas que tiene dos sitios de unión específicos para PD-1, dos sitios de unión específicos para LAG-3, una región de Fc de IgG4 variante diseñada para  
25 prolongar la vida media, y Dominios Promotores de Heterodímeros

que contienen cisteína de hélice E/K. Como se proporciona en más detalle a continuación, DART A comprende las especificidades de unión (*es decir*, los Dominios de VH y VL) de un anticuerpo anti-PD-1 humanizado (mAb 6 de hPD-1) y un  
 5 anticuerpo anti-LAG-3 humanizado (mAb 1 de hLAG3). La secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas de polipéptidos de DART A es (**SEQ ID NO:63**):

```

    DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDVS SVVAWYQQKP GKAPKLLIYS
    ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYSTPWTFGG
10  GTKLEIKGGG SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSCKAS GYSFTSYWMN
    WVRQAPGQGL EWIGVIHPSD SETWLDQKFK DRVTITVDKS TSTAYMELSS
    LRSEDVAVYY CAREHYGTSP FAYWGQGLTV TVSSGGCGGG EVAACEKEVA
    ALEKEVAALE KEVAALEKES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT
    LYITREPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
15  RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
    LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
    DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSLG
  
```

**[00290]** En **SEQ ID NO:63**, los residuos de aminoácidos 1-107 corresponden con la secuencia de aminoácidos de un Dominio de  
 20 VL de un anticuerpo monoclonal humanizado capaz de unirse a LAG-3 (mAb 1 de hLAG3); los residuos 108-115 corresponden con el péptido separador de intervención (**Enlazador 1**: GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); los residuos 116-234 corresponden con el Dominio de VH de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un  
 25 PD-1 (mAb 6 de hPD-1, **SEQ ID NO:57**, en donde X<sub>1</sub> es I); los

residuos 235-240 corresponden con un péptido separador de intervención (**Enlazador 2:** GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); los residuos 241-268 corresponden con un Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína (hélice E) (EVAACEK-EVAALEK-EVAALEK-  
 5 EVAALEK (**SEQ ID NO:20**)); los residuos 269-280 corresponden con una Región de Bisagra de IgG4 estabilizada (**SEQ ID NO:36**); los residuos en 281-496 corresponden con una variante de Dominio de CH2-CH3 de IgG4 que comprende las sustituciones M252Y/S254T/T256E y carecen del residuo C-terminal.

10 **[00291]** La secuencia de aminoácidos de la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de DART A es (**SEQ ID NO:64**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QOKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KGGSGGGGQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTD  
 15 YNMDWVRQAP GQGLEWMGDI NPDNGVTIYN QKFEGRVTMT TDTSTSTAYM  
 ELRSLRSDDT AVYYCAREAD YFYFDYWGQG TTLTVSSGGC GGGKVAACKE  
 KVAALKEKVA ALKEKVAALK E

**[00292]** En **SEQ ID NO:64**, los residuos de aminoácidos 1-111 corresponden con la secuencia de aminoácidos de un Dominio de  
 20 VL de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a un PD-1 (mAb 6 de hPD-1, **SEQ ID NO:58 en donde**  $X_1$  es S y  $X_2$  es Q); los residuos 112-119 corresponden con un péptido separador de intervención (**Enlazador 1:** GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)); los residuos 120-237 corresponden con un Dominio de VH of a  
 25 anticuerpo monoclonal humanizado capaz de unirse a LAG-3 (mAb

1 de hLAG3); los residuos 238-243 corresponden con un péptido  
 enlazador de separación que contiene cisteína (**Enlazador 2:**  
 GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)); los residuos 244-271 corresponden con  
 un Dominio Promotor de Heterodímeros que contiene cisteína  
 5 (hélice K) (KVAACKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:21**)).

**[00293]** La capacidad de DART A para simular las células T se  
 examinaron en un ensayo de enterotoxina tipo B de  
*Staphylococcus aureus* ("**SEB**"). SEB es un superantígeno  
 microbiano capaz de activar una gran proporción de células T  
 10 (5-30%) en donadores sensibles a SEB. SEB se une a MHC II fuera  
 de la muesca de unión del péptido y de este modo es dependiente  
 de MHC II, pero no restringido y mediado por TCR. La  
 estimulación de SEB de células T resulta en la proliferación  
 oligoclonal de células T y producción de citocinas (aunque  
 15 puede observarse la variabilidad del donador). A las 48 horas  
 de estimulación con SEB, los PMBC sobrerregulan PD-1 y LAG-3  
 con una intensificación adicional en el día 5, después del  
 cultivo secundario en placas con 96pozos con estimulación con  
 SEB. La sobrerregulación de las proteínas de PD-1 y LAG-3 en  
 20 los puntos de control inmune después de la estimulación con  
 SEB de los PBMC limita la liberación de citocina después de la  
 estimulación con SEB. La capacidad de DART A para intensificar  
 la liberación de citocinas a través de la inhibición de puntos  
 de control se examinó y comparó con la actividad de los  
 25 anticuerpos anti-PD-1 y anti-LAG-3 progenitores solos y en

combinación.

**[00294]** Brevemente, los PBMC se purificaron utilizando el método de centrifugación de gradiente de densidad utilizando el Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante a partir de sangre completa bajo el consentimiento informado de donadores saludables (Biological Specialty Corporation) y células T donde después se purificaron utilizando el Kit de células T de humano Dynabeads® Untouched (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los PBMC purificados se cultivaron en medio de RPMI + 10% de FBS inactivado por calor + Penicilina/Estreptomicina al 1% en matraces volumétricos T-25 durante 2-3 días solos o con SEB (Sigma-Aldrich) a 0.5 ng/mL (estimulación primaria). Al término de la primera ronda de estimulación con SEB, los PBMC se lavaron dos veces con PBS y se sembraron en placas de forma inmediata en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos a una concentración de  $1-5 \times 10^5$  células/pozo en medio solo, media con un anticuerpo de control, medio con SEB a 0.5 ng/mL (estimulación secundaria) y sin anticuerpo, o medio con SEB y DART A, una IgG de control o un anticuerpo anti-PD-1 +/- un mAb anti-LAG-3, y cultivado durante 2-3 días adicionales. Al término de la segunda estimulación, los sobrenadantes se cosecharon para medir la secreción de citocinas que utilizan kits de ELIS DuoSet de humano para IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10, y IL-4 (R&D Systems) de acuerdo con las

instrucciones del fabricante.

[00295] En estos análisis, DART A (una molécula biespecífica de PD-1 x LAG-3) y los anticuerpos de PD-1 x LAG-3 se utilizaron a una concentración de 0.0061, 0.024, 0.09, 0.39, 1.56, 6.25 o 5 25 nM. Para estos estudios, donde se utiliza una combinación de anticuerpos, cada anticuerpo se proporciona a la concentración indicada y de este modo la concentración del anticuerpo total es dos veces la concentración utilizada para cada anticuerpo (*es decir*, 0.0122, 0.048, 0.18, 0.78, 3.12, 10 12.5 o 50 nM). La **Figura 7** muestra los perfiles de secreción de IFN $\gamma$  a partir de los PBMC estimulados con SEB a partir de un donador representativo (D: 56041). Se observaron resultados similares para moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 que comprenden dominio de VH/VL a partir de anticuerpos de PD-1 x 15 LAG-3 alternativos, y para moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 que tienen estructura alternativas (*véase, por ejemplo, Figura 3C*, y para numerosos donadores.

[00296] Los resultados de esos estudios demuestran que las moléculas biespecíficas de PD-1 x LAG-3 intensifican de forma 20 dramática la producción de IFN $\gamma$  de los PBMC estimulados por SEB después de la estimulación. Esto resultados muestran que las moléculas biespecíficas que dirigen dos rutas inmunomoduladoras fueron más potentes que la combinación de anticuerpos separados que dirigen las mismas rutas.

## Ejemplo 2

### Moléculas Biespecíficas de PD-1 x CTLA-4

[00297] Las moléculas biespecíficas que tienen especificidad para PD-1 y CTLA-4 pueden generarse utilizando los métodos proporcionados en la presente y conocidos en la técnica. La estructura general de las cadenas de polipéptidos de diversas moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 se proporciona en la **Tabla 8**. En particular, las moléculas biespecíficas del diacuerpo bivalente que comprenden dos cadenas de polipéptidos, tienen un sitio de unión para PD-1 y un sitio de unión para CTLA-4 y pueden generarse en donde las cadenas de polipéptidos tienen la estructura general de Variación I (también véase, *por ejemplo, Figura 1*). Las moléculas biespecíficas del diacuerpo bivalente que comprende tres cadenas de polipéptidos tiene un sitio de unión para PD-1, un sitio de unión para CTLA-4 y una Región de Fc que puede generarse en donde las cadenas de polipéptidos tienen la estructura general de la Variación II (también véase, *por ejemplo, Figura 4A*). Las moléculas biespecíficas del diacuerpo tetravalente, que comprende cuatro cadenas de polipéptidos, tiene dos sitios idénticos de unión para PD-1, dos sitios idénticos de unión para CTLA-4 y puede generarse una Región de Fc en donde las cadenas de polipéptidos tiene la estructura general de las Variaciones III o IV (también véase, *por ejemplo, Figuras 3A-3C*). Además, las moléculas biespecíficas trivalentes, que comprenden cuatro

cadenas de polipéptidos tienen dos sitios de unión para PD-1 y un sitio de unión para CTLA-4 (o dos sitios de unión para CTLA-4 y un sitio de unión para PD-1), y puede generarse una Región de Fc en donde las cadenas de polipéptidos tienen la estructura general de la Variación V (también véase, *por ejemplo*, **Figura 6A**). Además, las moléculas biespecíficas bivalentes que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos tienen un sitio de unión para PD-1, un sitio de unión para CTLA-4 y puede generarse una Región de Fc en donde las cadenas de polipéptidos tienen la estructura general de la Variación VI (también véase, *por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos No. 7,695,936 y Publicaciones de Patente de PCT WO 2011/143545).

| <b>Tabla 8</b>   |                              |                                                                                                         |
|------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Variación</b> | <b>Cadena de Polipéptido</b> | <b>Dominios</b>                                                                                         |
| I                | Primera                      | (VL1) – (Enlazador 1) – (VH2) – (Enlazador 2) – (HPD)                                                   |
|                  | Segunda                      | (VL2) – (Enlazador 1) – (VH1) – (Enlazador 2) – (HPD)                                                   |
| II               | Primera                      | (VL1) – (Enlazador 1) – (VH2) – (Enlazador 2) – (HPD) – (Enlazador 3) – (Dominio de CH2-CH3 modificado) |
|                  | Segunda                      | (VL2) – (Enlazador 1) – (VH1) – (Enlazador 2) – (HPD)                                                   |
|                  | Tercera                      | (Linker3) – (Dominio de CH2-CH3 modificado)                                                             |
| III              | Primera y Tercera            | (VL1) – (Enlazador 1) – (VH2) – (Enlazador 2) – (HPD) – (Enlazador 3) – (Dominio de CH2-CH3)            |
|                  | Segunda y Cuarta             | (VL2) – (Enlazador 1) – (VH1) – (Enlazador 2) – (HPD)                                                   |
| IV               | Primera y Tercera            | (VL1) – (Enlazador 1) – (VH2) – (Enlazador 2) – (CH1) – (Bisagra) – (Dominio de CH2-CH3)                |
|                  | Segunda y Cuarta             | (VL2) – (Enlazador 1) – (VH1) – (Enlazador 2) – (CL)                                                    |

| <b>Tabla 8</b>   |                              |                                                                                                         |
|------------------|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Variación</b> | <b>Cadena de Polipéptido</b> | <b>Dominios</b>                                                                                         |
| V                | Primera                      | (VL1) – (Enlazador 1) – (VH2) – (Enlazador 2) – (HPD) – (Enlazador 3) – (Dominio de CH2-CH3 modificado) |
|                  | Segunda                      | (VL2) – (Enlazador 1) – (VH1) – (Enlazador 2) – (HPD)                                                   |
|                  | Tercera                      | (VH3) – (CH1) – (Bisagra) – (Dominio de CH2-CH3 modificado)                                             |
|                  | Cuarta                       | (VL3) – (CL)                                                                                            |
| VI               | Primera                      | (VL1) – (Enlazador 1) – (VH2) – (Enlazador 2) – (HPD) – (Enlazador 3) – (Dominio de CH2-CH3 modificado) |
|                  | Segunda                      | (VL2) – (Enlazador 1) – (VH1) – (Enlazador 2) – (HPD)                                                   |
|                  | Tercera                      | (VL3) – (Enlazador 4) – (VH3) – (CH1) – (Bisagra) – (Dominio de CH2-CH3 modificado)                     |
| VII              | Primera                      | (VH1) – (CH1) – (Bisagra) – (Dominio de CH2-CH3 modificado)                                             |
|                  | Segunda                      | (VL1) – (CL)                                                                                            |
|                  | Tercera                      | (VH2) – (CH1) – (Bisagra) – (Dominio de CH2-CH3 modificado)                                             |
|                  | Cuarta                       | (VL2) – (CL)                                                                                            |

HPD = Dominio Promotor de Heterodímeros

**[00298]** Para cada Variación de las moléculas biespecíficas se proporcionan en la **Tabla 8**:

- (a) VL1 y VH1 son los Dominios Variables de un anticuerpo anti-PD-1 y VL2 y VH2 son los Dominios Variables de un anticuerpo anti-CTLA-4; o
- (b) VL1 y VH1 son los Dominios Variables de un anticuerpo anti-CTLA-4 y VL2 y VH2 son los Dominios Variables de un anticuerpo anti-PD-1.

Para las Variaciones V y VI: VL3 y VH3 son los Dominios Variables de un anticuerpo anti-PD-1 o son los Dominios

Variables de un anticuerpo anti-CTLA-4.

**[00299]** Los Enlazadores, Dominios Promotores de Heterodímeros y regiones constantes (*por ejemplo*, CH1, Bisagra, Dominios de CH2-CH3) útiles en la generación de tales moléculas  
 5 biespecíficas se proporcionan en lo anterior. En particular, como se detalla en la presente para moléculas cuyas primera y tercera cadenas de polipéptidos no son idénticas, los Dominios de CH2-CH3 se modifican para promover la heterodimerización y reducir o prevenir la homodimerización, por ejemplo al  
 10 modificar el Dominio de CH2-CH3 una cadena comprende un "orificio" y modificar los Dominios de CH2-CH3 en la otra cadena para comprender una "perilla". Como se detalla en lo anterior, los Dominio de Bisagra y/o de CH2-CH3 pueden comprender sustituciones de aminoácidos que estabilizan las  
 15 moléculas biespecíficas y/o alteran la función efectora y/o intensifican la vida media en suero.

20

### **Ejemplo 3**

#### **Moléculas Adaptadoras Biespecíficas Universales ("UBA")**

**[00300]** Alternativamente, una molécula biespecífica (*por ejemplo*, un anticuerpo biespecífico, un diacuerpo biespecífico, molécula de unión trivalente, *etc.*) puede  
 25 interpretarse que comprende un sitio de unión al epítipo que

se une específicamente a PD-1 (o CTLA-4) y un segundo sitio de unión al epítipo que se une específicamente a un hapteno, *por ejemplo*, isotiocianato de fluoresceína (también conocido como fluoroisotiocianato o FITC). Tal molécula biespecífica sirve  
 5 como una molécula adaptadora biespecífica universal ("**UBA**") capaz de co-ligar un dominio de unión específico a PD-1 (o CTLA-4) con una molécula de unión conjugada a fluoresceína (*por ejemplo*, un anticuerpo, scFv, etc.) específica a CTLA-4 (o PD-1). Por ejemplo, puede utilizarse el brazo reactivo de FITC de  
 10 tal molécula adaptadora biespecífica universal para unirse a un anticuerpo etiquetado con FITC que une CTLA-4 (o PD-1) genera de este modo una molécula adaptadora biespecífica universal que se adapta para unirse a PD-1 y CTLA-4. Tales moléculas adaptadoras biespecíficas universales son útiles  
 15 para la evaluación rápida de las moléculas biespecíficas.

**[00301]** El anticuerpo anti-fluoresceína, 4-4-20 ("**mAb 4-4-20**") puede emplearse como una Fuente de dominios de unión específica a FITC (Gruber, M. *et al.* (1994) "*Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli*", J. Immunol. 152(11): 5368-  
 20 5374).

**[00302]** La secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Pesada de mAb 4-4-20 (**SEQ ID NO:65**) (los residuos de CDR<sub>H</sub> se subrayan):

25 EVKLD~~ET~~GGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ

IRNKPYNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNNLRV EDMGIYYCTG

SYYGMDYWGQ GTSVTVSS

[00303] Secuencia de aminoácidos del Dominio Variable de Cadena Ligera de mAb 4-4-20 (**SEQ ID NO:66**) (los residuos de CDR<sub>L</sub> se subrayan):

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNGNTYLRW YLQKPGQSPK

VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP

WTFGGGTKLE IK

[00304] Pueden utilizarse cualquiera de los formatos  
 10 biespecíficos provistos en la presente (véase, *por ejemplo*,  
**Tablas 1, 2, 3, y 4**). Las moléculas biespecíficas preferidas  
 comprenden únicamente un sitio de unión a hapteno (*por ejemplo*,  
 fluoresceína) y unirá un anticuerpo etiquetado con un solo  
 hapteno, mostrando de este modo una relación 1:1 de molécula  
 15 adaptadora biespecífica universal to anticuerpo etiquetado por  
 hapteno en los complejos resultantes. Tales moléculas  
 adaptadoras biespecíficas universales pueden construirse, por  
 ejemplo, utilizando los Dominios de VL y VH de un anticuerpo  
 anti-PD-1 y un anticuerpo anti-fluoresceína. De preferencia,  
 20 tal molécula adaptadora biespecífica universal es un diacuerpo  
 unido de forma covalente o una molécula de unión trivalente  
 que comprende dos, tres, cuatro, cinco o más cadenas de  
 polipéptidos. Se proporcionan a continuación moléculas  
 adaptadoras biespecíficas universales representativas que  
 25 pueden interpretarse.

**A. UBA 1**

**[00305]** Una molécula adaptadora biespecífica universal que puede generarse es un diacuerpo enlazado de forma covalente  
 5 compuesto de dos cadenas de polipéptidos que comprenden sitio de unión al epítipo de PD-1 y un sitio de unión de fluoresceína ("UBA 1").

**[00306]** La primera cadena de polipéptidos de **UBA 1** comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, el Dominio  
 10 de VL de mAb 4-4-20 (**SEQ ID NO:66**), un péptido separador de intervención (**Enlazador 1**, GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)), el Dominio de VH de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:57**, en donde  $X_1$  es I)), un péptido separador de intervención (**Enlazador 2**, GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)), el Dominio Promotor de Heterodímeros con hélice E:  
 15 EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:18**)), y un C-término.

**[00307]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la primera cadena de polipéptidos de **UBA 1** es (**SEQ ID NO:67**):

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK  
 20 VLIYKVSNRG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
 WTFGGGTKLE IKGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL  
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEK

25 **[00308]** La segunda cadena de polipéptidos de UBA 1 comprende,

en dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, un Dominio de VL de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:58**, en donde  $X_1$  es S y  $X_2$  es Q)), un péptido separador de intervención (**Enlazador 1**, GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)), el Dominio de VH of mAb 4-4-20 (**SEQ ID NO:65**)), un péptido separador de intervención (**Enlazador 2**, GGCGGG (**SEQ ID NO:6**)), el Dominio Promotor de Heterodímeros de hélice K: KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE (**SEQ ID NO:19**)) y un C-término.

**[00309]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la segunda cadena de polipéptidos de **UBA 1** es (**SEQ ID NO:68**):

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGKTKVEI KGGGGSGGGG EVKLDETGGG LVQPGRPMKL SCVASGFTFS
DYWMNWVRQS PEKGLEWVAQ IRNKPYNYET YYSDSVKGRF TISRDDSKSS
VYLQMNNLRV EDMGIYYCTG SYYGMDYWGQ GTSVTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

```

## B. UBA 2

**[00310]** Como se proporciona en lo anterior, al incorporar Dominios de CH2-CH3 de IgG sobre una cadena de polipéptidos de un diacuerpo tal como **UBA 1** permitirá que se forme un diacuerpo biespecífico que contiene la Región de FC de cuatro cadenas complejo. De este modo, una segunda molécula adaptadora biespecífica universal que puede generarse es un diacuerpo enlazado de forma covalente compuesto de cuatro cadenas de

polipéptidos comprenden dos sitios de unión de PD-1 al epítipo, dos sitios de unión a fluoresceína, y una Región de Fc ("UBA 2"). Se observará que **UBA 2** puede unir dos moléculas etiquetadas con fluoresceína mediante los dos sitios de unión  
5 de fluoresceína.

**[00311]** La primera y tercera cadenas de polipéptidos de **UBA 2** comprenden, en dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, un Dominio de VL de un mAb 4-4-20 (**SEQ ID NO:66**), un péptido separador de intervención (**Enlazador 1**, GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)), el Dominio de VH de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:57**, en donde  $X_1$  es I)), un péptido separador de intervención (**Enlazador 2**, GGCGGG (**SEQ ID NO:7**)), el Dominio Promotor de Heterodímeros con hélice E: EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:18**)), un péptido separador de intervención  
10 (**Enlazador 3**, GGDKTHTCPPCP (**SEQ ID NO:31**)), una Región de Fc de IgG1 que comprende las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO:43**), en donde X es K), y un C-término.

**[00312]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la primera y tercera cadenas de polipéptidos de **UBA 2** es (**SEQ ID NO:69**):  
20

```
DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE IKGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT
SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY
25 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL
```

EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 5 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS  
 PGK

**[00313]** La segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de **UBA 2** son idénticas a la segunda cadena de polipéptidos de **UBA 1**. De este modo, cada una de la segunda y cuarta cadenas de polipéptidos de UBA 2 tienen la secuencia de aminoácidos de  
 10 **SEQ ID NO:68**.

### C. UBA 3

**[00314]** Una tercera molécula adaptadora biespecífica  
 15 universal que puede generarse es un diacuerpo enlazado de forma covalente compuesto de tres cadenas de polipéptidos que comprenden un sitio de unión al epítipo de PD-1, un sitio de unión a fluoresceína, y una Región de Fc ("**UBA 3**").

**[00315]** La primera cadena de polipéptidos de **UBA 3** comprende,  
 20 en dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, el Dominio de VL de mAb 4-4-20 (**SEQ ID NO:66**), un péptido separador de intervención (**Enlazador 1**, GGGSGGGG (**SEQ ID NO:5**)), el Dominio de VH de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:57**, en donde  $X_1$  es I)), un péptido separador de intervención (**Enlazador 2**, GGCGGG (**SEQ ID**  
 25 **NO:6**)), el Dominio Promotor de Heterodímeros con hélice E:

EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK (**SEQ ID NO:18**)), un péptido  
 separador de intervención (**Enlazador 3**, GGGDKTHTCPPCP (**SEQ ID**  
**NO:31**)), una Región de Fc de IgG1 "que porta la perilla" que  
 comprende las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO:44**, en donde  
 5 X es K)), y un C-término.

**[00316]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la  
 primera cadena de polipéptidos de **UBA 3** es (**SEQ ID NO:70**):

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNQNTYLRW YLQKPGQSPK  
 VLIYKVSNRFS SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
 10 WTFGGGKLE IKGGGSGGGG QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT  
 SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLVTVSSG GCGGGEVAAL  
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 15 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL  
 PGK

**[00317]** La segunda cadena de polipéptidos de **UBA 3** puede ser  
 20 idéntica a la segunda cadena de polipéptidos de **UBA 1**. De este  
 modo, la segunda cadena de polipéptidos de **UBA 3** tiene la  
 secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:68**.

**[00318]** La tercera cadena de polipéptidos de **UBA 3** comprende,  
 en dirección N-terminal a C-terminal, un N-término, un péptido  
 25 separador (**Enlazador 3**, DKHTHTCPPCP (**SEQ ID NO:26**)), una Región

de Fc de IgG1 “que porta el orificio” que comprende las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO:45**, en donde X es K)), y un C-término.

**[00319]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la  
5 tercera cadena de polipéptidos de **UBA 3** es (**SEQ ID NO:71**):

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED  
PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK  
GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG  
10 NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

#### **D. UBA 4**

**[00320]** Una cuarta molécula adaptadora biespecífica universal que puede generarse es una molécula de unión  
15 trivalente compuesta de cuatro cadenas de polipéptidos que comprenden dos sitios de unión al epítipo de PD-1, un sitio de unión a fluoresceína, y una Región de Fc (“**UBA 4**”).

**[00321]** La primera cadena de polipéptidos de **UBA 4** es idéntica a la primera cadena de polipéptidos de **UBA 3**. De este  
20 modo, la primera cadena de polipéptidos de **UBA 4** tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:70**.

**[00322]** La segunda cadena de polipéptidos de **UBA 4** es idéntica a la segunda cadena de polipéptidos de **UBA 1**. De este modo, la segunda cadena de polipéptidos de **UBA 4** tiene la  
25 secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:68**.

**[00323]** La tercera cadena de polipéptidos de **UBA 4** comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, el Dominio de VH de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:57**, en donde  $X_1$  es I)), un Dominio de CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO:40**), una Región de Bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO:33**), una Región de Fc de IgG1 "que porta el orificio" que comprende las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO:45**, en donde X es K)), y un C-término.

**[00324]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la tercera cadena de polipéptidos de **UBA 4** es (**SEQ ID NO:72**):

```

10  QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV
    IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
    YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
    YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSVTVTV PSSSLGTQTY
    ICNVNHKPSN TKVDKRVEPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK
15  DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
    TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
    YTLPPSREEM TKNQVSLSCA VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL
    DSDGSFFLVS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNRYTQ KSLSLSPGK

```

**[00325]** La cuarta cadena de polipéptidos de **UBA 4** comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, el Dominio de VL de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:58**, en donde  $X_1$  es S y  $X_2$  es Q)), un Dominio de CL (por ejemplo, un Dominio Kappa de IgG (**SEQ ID NO:38**), y un C-término.

**[00326]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la cuarta cadena de polipéptidos de **UBA 4** es (**SEQ ID NO:73**):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL  
 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY  
 TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV  
 5 THQGLSSPVT KSFNRGEC

### E. UBA 5

[00327] Una quinta molécula adaptadora biespecífica universal que puede generarse es una molécula de unión  
 10 trivalente compuesta de tres cadenas de polipéptidos comprenden dos sitios de unión al epítipo de PD-1, un sitio de unión a fluoresceína, y una Región de Fc ("**UBA 4**") (véase, *por ejemplo*, **Figura 6C-6D**).

[00328] La primera cadena de polipéptidos de **UBA 5** es  
 15 idéntica a la primera cadena de polipéptidos de **UBA 3**. De este modo, la primera cadena de polipéptidos de UBA 5 tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:70**.

[00329] La segunda cadena de polipéptidos de **UBA 5** es idéntica a la segunda cadena de polipéptidos de **UBA 1**. De este  
 20 modo, la segunda cadena de polipéptidos de UBA 5 tiene la secuencia de aminoácidos de **SEQ ID NO:68**.

[00330] La tercera cadena de polipéptidos de **UBA 5** comprende, en dirección N-terminal a C-terminal, el Dominio de VL de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:58**, en donde  $X_1$  es S y  $X_2$  es Q), un  
 25 péptido separador de intervención (**Enlazador 4**,

GGGSGGGSGGGGS (**SEQ ID NO:37**)), el Dominio de VH de mAb 6 de PD-1 (**SEQ ID NO:57**, en donde  $X_1$  es I)), un Dominio de CH1 de IgG1 (**SEQ ID NO:40**), una Región de Bisagra de IgG1 (**SEQ ID NO:33**), una Región de Fc de IgG1 "que porta el orificio" que  
 5 comprende las sustituciones L234A/L235A (**SEQ ID NO:45**, en donde X es K)), y un C-término.

**[00331]** De este modo, la secuencia de aminoácidos de la tercera cadena de polipéptidos de **UBA 5** es (**SEQ ID NO:74**):

```

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
10 LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGTKVEI KGGGSGGGG SGGGSQVQL VQSGAEVKKP GASVKVSCA
SGYSFTSYWM NWVRQAPGQG LEWIGVIHPS DSETWLDQKF KDRVITITVDK
STSTAYMELS SLRSEDNAVY YCAREHYGTS PFAYWGQGTI VTVSSASTKG
PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
15 VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDK
THTCPPCPAP EAAGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF
YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV
20 FSCSVMHEAL HNRVTQKSLS LSPGK

```

**[00332]** Utilizando métodos convencionales, los anticuerpos anti-CTLA-4 puede etiquetarse con fluoresceína. Cuando tales moléculas etiquetadas se incuban en presencia de una molécula adaptadora biespecífica universal provista en lo anterior que  
 25 tiene un sitio de unión al epítipo que une un PD-1 y un sitio

de unión al epítipo que se une a fluoresceína, forman una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4, la cual puede evaluarse como se describe a continuación.

**[00333]** Se apreciará en vista de las enseñanzas provistas en la presente que Dominios de VH, Dominios de VL, Enlazadores, dominios promotores de heterodímeros, y/o Dominios Constantes de IgG diferentes pueden utilizarse para generar moléculas adaptadores biespecíficas universales. Por ejemplo, pueden utilizarse Dominios de VH y VL de un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o un anticuerpo anti-PD-1 diferente en lugar de los Dominios de VH y VL del anticuerpo anti-PD-1 empleado para generar moléculas adaptadoras biespecíficas universales alternativas o equivalentes. Alternativamente, los Dominios de VH y VL de un anticuerpo anti-CTLA-4 pueden utilizarse en lugar de los Dominios de VH y VL del anticuerpo anti-fluoresceína para generar moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que tengan la estructura general de Variaciones I, II, III, V y VI provistas en lo anterior. Tales moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 pueden utilizarse directamente en los ensayos descritos a continuación.

#### **Ejemplo 4**

##### **Ensayos**

**[00334]** Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención pueden caracterizarse en cualquiera de una

variedad de formas. En particular, las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención pueden evaluarse por su capacidad de unirse inmuno-específicamente a las moléculas de PD-1 y CTLA-4 (*por ejemplo*, cuando se presentan en una superficie celular, *etc.*), y/o puede determinarse la cinética de unión de las interacciones con antígeno. Cuando las moléculas biespecíficas comprenden una Región de Fc (o porción de la misma), puede evaluarse su capacidad para mostrar interacciones Fc-FcγR, *por ejemplo*, la unión específica de una Región de Fc (o porción de la misma) a un FcγR, mediación de la función efectora, transducción de señal, *etc.* La actividad inmunomoduladora y/o eficacia anti-tumor *in vivo* de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención pueden evaluarse utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* conocidos en la técnica.

**A. Preparación de Células inmunes y Células que Expresan PD-1 y/o CTLA-4**

**1. Aislamiento de subpoblaciones de PBMC y Células inmunes de Sangre completa de Humano**

[00335] Se aislaron PBMC de donadores humanos saludables aislados de la sangre total, *por ejemplo*, utilizando el gradiente de centrifugación Ficoll. Brevemente, la sangre completa se diluyó 1:1 con solución salina regulada con fosfato (PBS) estéril. La sangre diluida (35 mL) se estratificó sobre

15 mL de Ficoll-Paque™ Plus en un tubo de 50 mL y los tubos se centrifugaron a 400 x g (1320 rpm) durante 30 minutos con el freno apagado. La capa leucocitaria entre las dos fases se recolectó en tubos de 50 mL y se centrifugó a 600 x g (1620  
5 rpm) durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y la pelletilla celular se lavó 3 veces con PBS (*por ejemplo*, al centrifugar los tubos a 600 x g (1620 rpm) durante 5 minutos). El conteo de células viables se determinó utilizando el tinte Azul de Tripán. Los PBMC se resuspendieron en un medio de  
10 cultivo completo (*por ejemplo*, RPMI 1640, FBS al 10%, pen/strep al 1%) y se incubaron 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante la noche o se procesaron aún más para aislar una subpoblación de células inmunes deseadas tal como células T, (*por ejemplo*, células T reguladoras, CD8, CD4), células NK, células dendríticas y  
15 monocitos como se describe a continuación.

**[00336]** Las subpoblaciones de células inmunes particulares se aislaron fácilmente a partir de los PBMC utilizando un kit de preparación comercial (*por ejemplo*, los kits de aislamiento de células T de humano Untouched™ para aislamiento de células  
20 T, células T de CD4, células T de CD8, Monocitos, Células Dendríticas (Life Technologies/ThermoFisher Scientific); el Kit de Células T de CD4+/CD35+ Reguladoras DYNABEADS® para el aislamiento de células T reguladoras (CD4+/CD25+) (ThermoFisher), *etc.*), de acuerdo con las instrucciones del  
25 fabricante. Después del aislamiento, la subpoblación de células

inmunes (*por ejemplo*, células T) se resuspendió en el medio de cultivo completo apropiado (*por ejemplo*, RPMI 1640, FBS al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, el cual puede suplementarse con citocinas (*por ejemplo*, IL-2, GM-CSF, IL-4, TNF- $\alpha$ , etc.) e  
5 incubarse a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante la noche. Como se proporciona en la presente, tales subpoblaciones purificadas son útiles para evaluar la expresión de la superficie celular de PD-1 y/o CTLA-4 y para evaluación de la actividad inmune estimulante de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de  
10 la invención.

## **2. Aislamiento de PBMC a partir de Sangre Completa de Mono Cynomolgus o Mono Rhesus**

**[00337]** Los PBMC de mono Cynomolgus o mono Rhesus se aislaron  
15 a partir de sangre completa, utilizando por ejemplo el gradiente de centrifugación Ficoll. Brevemente, se diluyó 1:3 sangre completa con PBS estéril. La sangre diluida (35 mL) se estratificó sobre 15 mL de Ficoll-Paque™ Plus al 90% (90 mL de Ficoll + 10 mL de PBS) en un tubo para centrífuga de propileno  
20 de 50 mL y se centrifugó a 931 x g (2000 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente con el freno apagado. La capa leucocitaria entre las dos fases se recolectó y transfirió en un tubo de 50 mL limpio y se lavó con 45 mL de PBS al centrifugar los tubos a 600 x g (1620 rpm) durante 5 minutos. El  
25 sobrenadante se desechó y la pelletilla se enjuagó 3x con PBS.

Los PBMC de mono Cynomolgus o Rhesus entonces se resuspendieron en 30 mL de medio de cultivo completo y el conteo de células viables se determinó por exclusión con tinte Azul de Tripán.

[00338] Las subpoblaciones de células inmunes particulares  
5 se aislaron fácilmente a partir de los PBMC de primate no humano utilizando un kit de preparación comercial (*por ejemplo*, células T Pan, células T de CD4+, y kits de aislamiento de células T reguladoras de CD4+/CD25+ (Miltenyl Biotech)), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.  
10 Alternativamente, puede utilizarse una clasificación de flujo citométrico que utiliza mAb específicos o de reactividad cruzada de primate no humano para la clasificación.

15           **3. Generación de Células Dendríticas derivadas de Células Mieloides Maduras o Inmaduras de Humano (mDC) a partir de Monocitos de Humano Aislados**

[00339] Los monocitos de humano se aíslan a partir de PBMC purificados derivados de donadores utilizando un kit de  
20 preparación comercial (*por ejemplo*, el kit de monocitos de humano Untouched™ (Life Technologies/ThermoFisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los monocitos de humano aislados se inducen para diferenciarse en mDC inmaduros de humano al cultivar los monocitos (*por ejemplo*, en  
25 Medio Esencial Mínimo alfa con un medio de nucleósidos ( $\alpha$ MEM)

+ suero negativo con AB de humano al 2% + penicilina/estreptomicina al 1%) durante 5-7 días en presencia del factor recombinante estimulador de colonias de macrófagos granulocitos de humano (*por ejemplo*, hGM-CSF; Peprotech, 100 ng/ml) e interleucina 4 de humano recombinante (hIL-4; Peprotech, 40 ng/ml). Los mDC inmaduros se cosecharon y lavaron con PBS al centrifugar los tubos a 600 x g (1620 rpm) durante 5 minutos para su uso como células estimuladoras en los ensayos de Reacción Mezclada de Linfocitos alogénicos (allo-MLR), tales como aquellos que se detallan a continuación.

**[00340]** En ciertos experimentos allo-MLR, los mDC inmaduros se indujeron para diferenciarse al agregar TNF $\alpha$  o un cóctel de citocinas adicionales (IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) y mitógenos (LPS) durante dos días adicionales de cultivo (*véase, por ejemplo*, Han, T. (2009) "*Evaluation of 3 Clinical Dendritic Cell Maturation Protocols Containing LPS and IFN-gamma*", J Immunother 32:399). La pureza, maduración y activación de mDC pudieron evaluarse por citometría de flujo utilizando uno o más de los siguientes anticuerpos: anti-CD14, anti-CD80, anti-CD83, anti-CD86, anti-HLA-DR; y los controles de isotipo apropiados. Los datos citométricos de flujo de tales evaluaciones pudieron adquirirse en un FACS Calibur/Fortessa (Becton Dickinson/BD Biosciences) y analizarse utilizando el software FlowJo (TreeStar).

**[00341]** Las células que expresan PD-1 y/o CTLA-4 pueden generarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células (*por ejemplo*, NSO, Jurkat, CHO, *etc.*) pueden diseñarse para expresar PD-1 y/o CTLA-4 utilizando  
5 vectores retrovirales que contengan el gen apropiado (*por ejemplo*, gen PD-1 de humano). Alternativamente, las células inmunes pueden estimularse para inducir o incrementar la expresión de PD-1 y/o CTLA-4. Brevemente, las células inmunes purificada (*por ejemplo*, PBMC, células T, células dendríticas,  
10 *etc.*) aisladas como se describe en lo anterior se cultivaron durante 2-6 días en presencia o ausencia de un mitógeno y se examinó la expresión de PD-1 y/o CTLA-4 en células no tratadas (Naïve) y estimuladas, *por ejemplo* utilizando citometría de flujo. Pueden utilizarse anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4  
15 comerciales para la evaluación preliminar de los patrones de expresión en células Naïve y en respuesta a la estimulación del mitógeno. Adicional u opcionalmente, pueden utilizarse las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención.

**[00342]** Los mitógenos que pueden utilizarse para tales  
20 estudios se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a: perlas de CD3/CD28, lipopolisacáridos (LPS), enterotoxina de los tipos A-E de *Staphylococcus aureus* (*por ejemplo*, SEB), acetato de miristato de forbol (PMA), fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (conA), mitógeno de  
25 hierba carmín (PWM), *etc.* Pueden utilizarse mitógenos

identificados como que inducen/intensifican la expresión de PD-1 y/o CTLA-4 en ensayos funcionales para evaluar la actividad estimuladora de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la presente invención. Véase por ejemplo los  
5 ensayos de "SEB" y "MLR" descritos en la presente.

### **B. Ensayos de Unión**

[00343] Los inmunoanálisis que pueden utilizarse para analizar la unión inmuno-específica de moléculas PD-1 o CTLA-4,  
10 reactividad cruzada de unión, o interacciones de Fc-FcγR incluyen, pero no se limitan a, sistemas de análisis competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencias western, radioinmunoanálisis, ELISA (análisis inmunosorbente enlazado a enzima), inmunoanálisis  
15 "estratificados", análisis de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, análisis inmunocromatográficos, análisis de inmunodifusión, análisis de aglutinación, análisis de fijación de complemento, análisis inmunotradiométrico, inmunoanálisis fluorescente, e  
20 inmunoanálisis de proteína A, etc. (véase, *por ejemplo*, Ausubel *et al.*, 2008, *Current Protocols in Molecular Biology*). La afinidad de unión a un antígeno objetivo típicamente se mide o determina por análisis estándar de antígeno-anticuerpo, tales como los análisis competitivos de Biacore, análisis de  
25 saturación, o inmunoanálisis tales como ELISA o RIA. La

clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), utiliza cualquiera de las técnicas conocidas por aquel con experiencia en el arte, se utiliza para análisis a base de inmunología o funcional para caracterizar las moléculas  
5 biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención.

**[00344]** Por ejemplo, los PBMC pueden prepararse como se describe en lo anterior. Donde los subconjuntos de células inmunes deseadas (*por ejemplo*, células T reguladoras, células T auxiliares, APC, *etc.*) pueden aislarse a partir de los PBMC  
10 purificados. Las células aisladas entonces se examinan la expresión de PD-1 y CTLA-4 en diversos subconjuntos celulares (*por ejemplo*, células T reguladoras, células T auxiliares, APC, *etc.*) por co-tinción y análisis FACS como se describe a continuación.

15

#### **1. Unión a la Superficie Celular (Ensayo de Saturación)**

**[00345]** La capacidad de moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que une un PD-1 y/o CTLA-4 expresado en la superficie  
20 celular puede medirse en ensayos a base de saturación/dilución utilizando una célula que exprese PD-1 y/o CTLA-4 (células objetivo). Tales células pueden ser células inmunes estimuladas para expresar PD-1 y/o CTLA-4, o una línea celular (*por ejemplo*, células de NSO) diseñada para sobreexpresar de forma  
25 estable moléculas de PD-1 y/o CTLA-4. Brevemente, las células

objetivo cultivadas (*por ejemplo*, células de NSO diseñadas para expresar PD1<sup>+</sup>) se cosechan y resuspenden (*por ejemplo*, alrededor de  $5 \times 10^6$  células/ml) en solución reguladora de bloqueo (*por ejemplo*, solución reguladora FACS + Suero AB de humano al 10%). Comenzando a concentraciones molares iguales (*por ejemplo*, 20nM en un total de 200  $\mu$ l) se preparan una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 para dilución en una placa de microtitulación separada y se diluyen en serie (*por ejemplo*, 1:4, 1:5, 1:10, etc.) 5-12 veces para generar una curva de 5-12 puntos. La concentración de partida más alta en todos los experimentos se determina de forma empírica. EL mismo volumen (*por ejemplo*, 50  $\mu$ l) de cada dilución se agrega a una nueva placa de microtitulación y a las células objetivo se agregan a cada pozo (*por ejemplo*,  $0.25 \times 10^6$  células/pozo) y se incuban (*por ejemplo*, a 4-25°C durante 30-120 minutos). Las células se lavan 1-3 veces (*por ejemplo*, la placa de microtitulación se hace girar a 600 x g (1620 rpm) durante 5 minutos y después se lava con solución reguladora de bloqueo y se hace girar de nuevo) y se resuspende en solución reguladora de bloqueo. Para la tinción secundaria, se selecciona el reactivo secundario apropiado, *por ejemplo* puede utilizarse un FC-APC anti-Humano de cabra para detectar los anticuerpos primarios de humano, mientras que un Fc de IgG Anti-Ratón de cabra de Alexa Fluor

647 se utiliza para detectar anticuerpos primarios de ratón. El reactivo secundario seleccionado se diluye en solución reguladora de bloqueo y se basa en la concentración secundaria individual, se elabora una solución madre y se lleva a alícuota  
5 el mismo volumen/pozo de la mezcla secundaria en pozos individuales y se incuba (*por ejemplo*, a 4-25°C durante 30-120 minutos). Las células se lavan como se describe en lo anterior y se resuspenden en solución reguladora de bloqueo. Las células teñidas se analizan por citometría de flujo. Los datos  
10 citométricos de flujo pueden adquirirse en un FACS Calibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa), analizarse como un medio de intensidad fluorescente utilizando el software FlowJo (TreeStar), y graficarse y ajustarse utilizando el logaritmo (agonista) contra la función de la pendiente de  
15 respuesta variable (cuatro parámetros) en el software Prism6 (Graphpad).

## **2. Unión al Receptor/Ligando y Ensayos de Señalización**

**[00346]** Los ensayos que pueden utilizarse para analizar la  
20 capacidad de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención para modular (*por ejemplo*, bloquear, inhibir, estimular, etc.) la unión y señalización al ligando se proporcionan con mayor detalle a continuación.

25

### **a. Unión al Receptor/Ligando de PD-1**

**[00347]** La capacidad de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 para inhibir PD-1 a partir de la unión de PD-L1 y/o PD-L2 puede evaluarse utilizando células que expresan PD-1 (células objetivo). Tales células pueden ser células inmunes  
5 estimuladas para que expresen PD-1, o una línea celular diseñada para expresar la molécula de PD-1, por ejemplo células de NSO que se transducen de forma retroviral con el gen PD-1 de humano. Brevemente, las células que expresan PD-1 (*por ejemplo*, NSO/PDCD1 (NSO-PD1<sup>+</sup>)) se cosechan y resuspenden (*por*  
10 *ejemplo*, alrededor de  $1.5 \times 10^6$  células/ml) en solución reguladora de bloqueo (*por ejemplo*, solución reguladora de bloqueo FACS + Suero AB de Humano al 10%) y se siembran en placas en una placa de microtitulación (*por ejemplo*,  $0.25 \times 10^6$  células/pozo). Comenzando a concentraciones molares iguales  
15 (*por ejemplo*, 20nM de un total de 200  $\mu$ l) de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1, un anti-CTLA-4, o se prepara una combinación de anticuerpos de anti-PD-1 y anti-CTLA-4 para dilución en una placa de microtitulación separada y se diluye en serie (*por ejemplo*,  
20 1:4, 1:5, 1:10, etc.) 5-12 veces para generar una curva de 5-12 puntos. La concentración de partida más alta en todos los experimentos se determina de forma empírica. El mismo volumen (*por ejemplo*, 50  $\mu$ l) de cada dilución se agrega a cada pozo de la placa de microtitulación que contiene las células objetivo.  
25 Para evaluar la inhibición de la unión de PD-L1 en la proteína

de fusión de PD-L1 soluble (*por ejemplo*, hPD-L1 (B7H1) TEV-hIgG1-Fc-biotina (Ancell)) se agregan a cada pozo con la excepción de los pozos de control negativo no teñidos y se incuban (*por ejemplo*, a 4-25°C durante 30-120 minutos). Para

5 evaluar la inhibición de la unión de PD-L2 en la proteína de fusión de PD-L2 soluble (*por ejemplo*, CD273 (PD-L2) muIgG/biotina (Ancell)) se agregan a cada pozo con la excepción de los pozos de control negativo no teñidos y se incuban (*por ejemplo*, a 4-25°C durante 30-120 minutos). Las células se lavan

10 1-3 veces (*por ejemplo*, la placa de microtitulación se hace girar a 600 x g (1620 rpm) durante 5 minutos y después se lava con solución reguladora de bloqueo y se hace girar de nuevo). Las células se resuspenden en solución reguladora de bloqueo con la excepción de los pozos de control negativo no teñidos,

15 el reactivo secundario apropiado para la detección de la proteína de fusión de PD-L1 o PD-L2 (*por ejemplo*, proteína secundaria etiquetada con estreptavidina-PE (eBiosciences)) se agregan e incuban (*por ejemplo*, a 4-25°C durante 15-120 minutos). Las células se lavan como se describe en lo anterior

20 y resuspenden en solución reguladora de bloqueo. Las células teñidas pueden analizarse por citometría de flujo. Los datos citométricos de flujo pueden adquirirse en un FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa), y analizarse para la pérdida en el medio de intensidad fluorescente de sPD-

25 L1 o sPD-L2 etiquetado en presencia de una molécula

biespecífica de PD-1 x CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1, un anti-CTLA-4, o una combinación de anticuerpos de anti-PD-1 y anti-CTLA-4 utilizando el software FlowJo (TreeStar), y se graficaron y ajustaron utilizando el logaritmo (agonista) 5 contra la función de la pendiente variable (cuatro parámetros) en el software Prism6 (Graphpad).

#### **b. Unión al Receptor/Ligando de CTLA-4**

10 **[00348]** La capacidad de moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 para inhibir CTLA-4 de la unión de CD80 y/o CD86 puede evaluarse utilizando células que expresan CTLA-4 (células objetivo). Tales células pueden ser células inmunes estimuladas para expresar CTLA-4, o una línea celular diseñada para 15 expresar CTLA-4, por ejemplo células de NSO transducidas de forma retroviral con el gen de CTLA-4 de humano. Brevemente, las células que expresan CTLA-4 se cultivan y resuspenden en solución reguladora de bloqueo (*por ejemplo*, solución reguladora de bloqueo FACS + Suero AB de Humano al 10%) y se 20 siembran en placas en una placa de microtitulación (*por ejemplo*,  $0.25 \times 10^6$ - $1.0 \times 10^6$  células/pozo). Comenzando a concentraciones molares iguales (*por ejemplo*, 20nM de un total de 200  $\mu$ l) de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4, se preparan un anticuerpo anti-PD-1, un anti-CTLA-4, o una 25 combinación de anticuerpos de anti-PD-1 y anti-CTLA-4 para

dilución en una placa de microtitulación separada y se diluye en serie (*por ejemplo*, 1:4, 1:5, 1:10, *etc.*) 5-12 veces para generar una curva de 5-12 puntos. La concentración de partida más alta en todos los experimentos se determina de forma empírica. El mismo volumen (*por ejemplo*, 50  $\mu$ l) de cada dilución se agrega a cada pozo de la placa de microtitulación que contiene las células objetivo. Para evaluar la inhibición de la unión de CD80 a la proteína de fusión de CD80 soluble (*por ejemplo*, hCD80-muIg-biotina (ADIPOGEN®)) se agrega a cada pozo con la excepción de los pozos de control negativo no teñidos y se incuban (*por ejemplo*, a 4-25°C durante 30-120 minutos). Para evaluar la inhibición de la unión de CD86 a la proteína de fusión de CD86 soluble (*por ejemplo*, hCD86-muIg-biotina (ADIPOGEN®)) se agrega a cada pozo con la excepción de los pozos de control negativo no teñidos y se incuban (*por ejemplo*, a 4-25°C durante 30-120 minutos). Las células se lavan 1-3 veces (*por ejemplo*, la placa de microtitulación se hace girar a 600 x g (1620 rpm) durante 5 minutos y después se lava con solución reguladora de bloqueo y se hace girar de nuevo). Las células se resuspenden en solución reguladora de bloqueo con la excepción de los pozos de control negativo no teñidos, el reactivo secundario apropiado para la detección de the CD80 o CD86 proteína de fusión (*por ejemplo*, proteína secundaria etiquetada con estreptavidina-PE (eBiosciences)) se agregan e incuban (*por ejemplo*, a 4-25°C durante 15-120 minutos). Las

células se lavan como se describe en lo anterior y resuspenden en solución reguladora de bloqueo. Las células teñidas pueden analizarse por citometría de flujo. Los datos citométricos de flujo pueden adquirirse en a FACSCalibur/Fortessa (Becton Dickinson/Fortessa), y analizarse para la pérdida en el medio de intensidad fluorescente de CD86 o CD80 etiquetada en presencia de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1, un anti-CTLA-4, o una combinación de anticuerpos de anti-PD-1 y anti-CTLA-4 utilizando el software FlowJo (TreeStar), y se graficaron y ajustaron utilizando el logaritmo (agonista) contra la función de la pendiente variable (cuatro parámetros) en el software Prism6 (Graphpad).

### **C. Ensayos con Reportero**

15 **[00349]** La actividad funcional de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 al bloquear la interacción de PD-1 con PD-L1 puede evaluarse utilizando un sistema reportero comercial desarrollado por Promega de acuerdo con la instrucción del fabricante. Brevemente, se utilizan dos líneas celulares  
20 diseñadas para funcionar como cualquiera de una línea estimuladora o línea de células reporteras. La línea estimuladora se diseñó a partir de una línea progenitora de CHO para expresar la molécula de PD-L1 y un activador de células T, el cual es un mAb agonista anti-CD3 de enlace de membrana  
25 [células CHO/PDL1]. La línea de células reporteras se diseñó a

partir de una línea progenitora de células de Jurkat positivas a CD3 para expresar un constructo reportero de luciferasa bajo el control de la transcripción del factor nuclear de las células T activadas (NFAT) [células de Jurkat de NFAT-luc2/PD-1]. Cuando se cultivan juntas, el agonista anti-CD3 expresado en la línea celular de CHO-PDL1 controla la expresión de luciferasa por la ruta de transducción de señal NFAT mediada por el acoplamiento del complejo de señalización TCR/CD3 presente en la línea celular de Jurkat-NFAT-luc/PD-1. En ausencia de anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1, la luciferasa se expresa a un nivel en relación con la señalización de TCR/CD3 pero se desmodula o inhibe por la presencia del eje de inhibición PD-1/PD-L1, el cual funciona como un freno. En presencia de moléculas que inhiben la señalización de PD-1/PD-L1 (*por ejemplo*, anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1), este eje de inhibición o "freno" se libera permitiendo la expresión intensificada de luciferasa que puede medirse. En consecuencia, puede evaluarse la actividad inhibidora de PD-1 de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 al cultivar CHO/PDL1 con NFAT-luc2/PD1 Jurkat (3H-D5). Brevemente, las CHO-PDL1 se siembran en placas una placa de microtitulación (*por ejemplo*, a  $4.0 \times 10^4$  células/pozo) y se cultivan durante la noche (*por ejemplo*, en medio RPMI que contiene FBS al 10% + 100ug/mL de Higromicina B + 500ug/mL de G418). Al siguiente día, se prepara una solución reguladora de análisis (*por ejemplo*, RPMI +FBS al

2%) junto con una dilución en serie de 5-12 puntos de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4, o un anticuerpo anti-PD-1 en la solución reguladora de análisis con puntos de mayor dilución de equivalencia molar igual (*por ejemplo*, 100-200 nM) y se preparan diluciones en serie de 5-12 puntos (*por ejemplo*, 1:4, 1:5, 1:10, *etc.*). En el siguiente orden, se retira una porción del medio de cultivo de las células a partir de la placa de microtitulación que contiene células de CHO/PDL1 adherentes y se agregan alícuotas de cada dilución a las células de CHO/PDL1. Las células de Jurkat de NFAT-luc2/PD-1 se cultivan y resuspenden en la solución reguladora de análisis y se agregan (*por ejemplo*,  $5.0 \times 10^4$  células/pozo en 40  $\mu$ l/pozo) a las células de CHO/PDL1). El co-cultivo se incuba (*por ejemplo*, durante 6 horas a 37°C). Al término de la incubación, se reconstituye el sustrato Bio-Glo (Promega) y se agrega a la placa de microtitulación equilibrada a temperatura ambiente. Después de la incubación (*por ejemplo*, 5-10 minutos) la densidad óptica de cada pozo se lee en un Lector de Placa de Múltiples Etiquetas VICTOR™ X4 (Perkin Elmer #2030-0040) a 450nm con una unidad de luz relativa (RLU) de luminiscencia como la lectura. Los datos entonces pueden graficarse y ajustarse utilizando el logaritmo (agonista) contra la función de la pendiente variable (cuatro parámetros) en el software Prism6 (Graphpad).

25 **[00350]** Ensayos de reportero similares se encuentran

disponibles para la señalización de CTLA-4 (*por ejemplo*, Kit de Bioensayo de Bloqueo de CTLA-4 (Promega)) y/o pueden generarse fácilmente para analizar la actividad funcional de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 al bloquear la  
5 interacción de CTLA-4 con sus ligandos respectivos.

#### **D. nsayos de Inmunomodulación**

**[00351]** Los ensayos que pueden utilizarse para analizar la actividad inmunomoduladora de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención incluyen ensayos de estimulación  
10 de mitógeno tales como el ensayo de "SEB" detallado en lo anterior, y ensayos de Reacción Mezclada de Linfocitos (MLR) tales como aquellos provistos en mayor detalle a continuación. Se espera que la capacidad de las moléculas biespecíficas de  
15 PD-1 x CTLA-4 de la invención module ambas rutas de inhibición de PD-1 y la CTLA-4 para proporcionar una estimulación intensificada en los ensayos cuando se compara con los anticuerpos anti-PD1 y anti-CTLA-4 solos o la combinación de tales anticuerpos.

20 **[00352]** Los PBMC o células T se aislaron de sangre de los mismos pacientes donadores saludables (autóloga) o no tratados (allogénica) por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Paque™ como se describe en lo anterior y se resuspendieron en un medio de cultivo completo. Para los ensayos de allo-MLR que emplean  
25 mDC, los monocitos se purificaron y maduraron como se describe

en lo anterior. Para los ensayos de allo-MLR de una vía (unidireccionales) las células respondedoras (*por ejemplo*, los PBMC) se co-cultivaron con células de estimulación en una placa de microtitulación. Dependiendo del contexto, las células  
5 estimulantes fueron DC, autólogas a PBMC (para auto-MLR, es decir, control negativo), o alogénicas a PBMC (para allo-MLR, es decir, control positivo). La relación de células respondedoras:estimulantes fue típicamente de 1:1 o 2:1, pero puede variar. Los co-cultivos se realizaron en presencia de  
10 cantidades molares iguales de diluciones en serie (*por ejemplo*, 1:4 1:5, 1:10, etc.) de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1, un anti-CTLA-4, una combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4, o los mAb isotipo correspondientes. Las diluciones de anticuerpo en serie  
15 pueden prepararse como se describe en lo anterior. Además, pueden utilizarse controles de poblaciones de una sola célula estimulados con o sin los mAb anti-CD3 +/- anti-CD28 como controles en tales experimentos. Las células estimuladoras (estimuladoras) se irradian previamente (*por ejemplo*, a 45  
20 grays [Gy] (4500 rads) utilizando un Irradiador de Sangre/Células Elan Gammacell® 3000 (Theratronics)) para prevenir la proliferación de las células estimuladoras y permitir únicamente la medición de la proliferación de las células respondedoras (respondedoras). Después de 5-7 días (el  
25 tiempo se ajustará para asegurar la expresión de PD-1 y CTLA-

4 durante el ensayo), se agregó [<sup>3</sup>H]-timidina (*por ejemplo*, 1  
 µCi/pozo (Perkin Elmer)) durante 18-48 horas adicionales. Se  
 midió la radioactividad incorporada en el ADN (*por ejemplo*, en  
 un contador de β-centelleos NTX TOPCount (Perkin Elmer)). Los  
 5 resultados se expresaron como cualquiera de los conteos medios  
 por minuto (cpm) o se expresaron como el índice de  
 estimulación (SI) permitiendo la comparación de resultados a  
 partir de diferentes donadores. SI se calculó como sigue:  
 conteos medios por minuto (cpm) a partir de las células  
 10 estimuladas divididos por cpm medio de las células no  
 estimuladas. Las respuestas MLR se consideraron positivas  
 cuando SI fue ≥3 para la estimulación inducida por PBMC y SI ≥  
 6 para la estimulación indicada por DC. Alternativamente, puede  
 medirse la proliferación utilizando un ensayo de proliferación  
 15 a base de CEFSE (Boks, M.A., et al. (2010) "*An optimized CFSE  
 based T-cell suppression assay to evaluate the suppressive  
 capacity of Treg induced by human tolerogenic dendritic cells*",  
 Scand J Immunol 72:158-168).

**[00353]** Los ensayos MLR adicionales que pueden utilizarse  
 20 para evaluar la actividad inmune estimulante de las moléculas  
 biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención se conocen en  
 la técnica. Véase, por ejemplo, Davies, J.K. et al. (2011)  
 "*Induction of alloantigen-specific anergy in human peripheral  
 blood mononuclear cells by alloantigen stimulation con co-  
 25 stimulatory signal blockade*", Journal of Visualized

Experiments: JoVE, (49), 2673; Kruisbeek, A.M., et al. (2004) "Proliferative Assays for T cell Function", CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 60:III:3.12.1-3.12.20; Wallgren, A.C. et al. (2006) "The Direct Pathway Of Human T-Cell Allorecognition Is Not  
 5 Tolerized By Stimulation con Allogeneic Peripheral Blood Mononuclear Cells Irradiates with High-Dose Ultraviolet", Ba. Scand J of Immunol 63:90-96; Levitsky, J. et al. (2009) "The Human 'Treg MLR' Immune Monitoring for Foxp3+ T regulatory cell generation, Transplantation 88:1303-11.

10

#### **E. Ensayos Anti-Tumor In Vivo**

**[00354]** The actividad anti-tumor de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención pueden evaluarse en diversos modelos animales conocidos en la técnica. Se espera  
 15 que el tratamiento con las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 de la invención inhiba el establecimiento del tumor y/o crecimiento del tumor en un mayor grado que el tratamiento con los anticuerpos anti-PD1 y anti- CTLA-4 solos o la combinación de tales anticuerpos.

20 **[00355]** Son en particular útiles los modelos de xenoinjerto de tumor en murinos. Brevemente, los ratones se implantaron con una línea de células de cáncer, o células de tumor de interés y se tratan con (i) una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 (ii) un anticuerpo anti-PD-1 (iii) un anticuerpo anti-  
 25 CTL4 (iv) una combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-

4, y (vi) un control sin tratamiento el cual puede ser vehículo solo y/o un anticuerpo irrelevante. El tratamiento puede comenzar antes de su implantación (*por ejemplo*, 1 día antes (*es decir*, día 1)); el mismo día de la implantación (*es decir*, día 0), o después del establecimiento de un tumor (*por ejemplo*, día 7). Los animales pueden recibir un solo tratamiento o pueden recibir múltiples tratamientos (*por ejemplo*, semanalmente después de la implantación). Los animales se monitorean con el tiempo para determinar el efecto *in vivo* de estas moléculas en el establecimiento del tumor y/o crecimiento. El crecimiento de los tumores puede monitorearse al medir los tumores y determinar el volumen de tumor (altura x ancho x longitud). Los animales tratados que mostraron una regresión de tumor completa pueden utilizarse para examinar la inmunidad específica del tumor al exponerlos de nuevo utilizando las mismas células o el tumor y células de tumor irrelevantes como un control. Además, estos modelos pueden modificarse para incluir un tratamiento de combinación con tratamientos estándar de cuidado tales como quimioterapia, radiación, etc.

**[00356]** Se conocen en la técnica numerosas líneas de células de cáncer que pueden trasplantarse las cuales pueden utilizarse en tales modelos de xenoinjerto e incluyen, pero no se limitan a: células de cáncer colorrectal MDST8, SW480 y SW620; células de cáncer gástrico AGS; células de melanoma UACC-62, A2058, y

LOX IMVI; células de cáncer de próstata 22rv; células de cáncer pancreático AsPC-1 y BxPc-3; células de cáncer renal Caki-1, A498 y 786-0; células de cáncer de vejiga HT-1197; células de cáncer mamario 4T1, MDA-MB-231; A549, cáncer de células de pulmón WX322; células de fibrosarcoma HT1080; células de linfoma de células del mazo HBL-2 de humano; células Raji de linfoma de Burkitt. En particular se prefieren los modelos de Xenoinjerto Derivado de Pacientes (PDX). Tales líneas de células de cáncer, o tumores derivados de pacientes se injertan en cepas de ratones inmunocomprometidos (*por ejemplo*, ratones desnudos, ratones Scid, ratones NOD, ratones nulos Rag 1, *etc.* (véase, *por ejemplo*, Belizario, J.E., (2009) "*Immunodeficient Mouse Models: An Overview*", Bentham Open 1874-2262/09) o ratones humanizados tales como ratones transgénicos con HLA-A2 de humano (véase, *por ejemplo*, Shultz, L.D., *et al.* (2012) "*Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges*", Nature Rev Immunol 12:786-798) como se describe en lo anterior. Además, para la evaluación de tales moléculas que modulan los puntos de control, los ratones inmunes inmunodeficientes pueden injertarse con componentes del sistema inmune humano (*por ejemplo*, reconstituidos con PBMC, células madre, células progenitoras inmunes de humano, *etc.*) antes o de forma simultánea con la implantación y tratamiento de las células de tumor deseadas y como se detalla en lo anterior.

### Ejemplo 5

#### **Estudios de Unión a Moléculas Biespecíficas de PD-1 x CTLA-4**

5 **[00357]** Se generaron diversas moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4, incluyendo diacuerpos que contienen la Región de Fc y moléculas trivalentes que contienen la Región Fc que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos. Se generaron tres diacuerpos que tiene cuatro cadenas de polipéptidos y que  
10 comprenden Dominios Promotores de Heterodímeros de hélice E/K y se acordaron las designaciones "**DART B**", "**DART C**", y "**DART D**". Se generó un diacuerpo que tiene cuatro cadenas y comprende Dominios de CH1/CL y se acordó la designación "**DART E**." Se generaron dos moléculas de unión trivalente que tienen cuatro  
15 cadenas y comprenden Dominios Promotores de Heterodímeros de hélice E/K y Dominios de CH1/CL y se acordaron las designaciones "**TRIDENT A**", y "**TRIDENT B**."

**[00358]** Además, se generaron diversos anticuerpos que tienen especificidad para PD-1 o CTLA-4. Se generó un anticuerpo  
20 específico para PD-1 y se acordó la designación "**MAb 6 de G4P de PD-1**". Se generaron tres anticuerpos específicos para CTLA-4 y se acordaron las designaciones "**MAb 1 de CTLA-4**", "**MAb 3 de CTLA-4 de G1AA**", y "**MAb 3 de CTLA-4 de G4P**."

**[00359]** La estructura y secuencias de aminoácidos de estas  
25 moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4, anticuerpos anti-PD-

1, anticuerpos anti-CTLA-4 se proporcionan en lo anterior y se resumen en la **Tabla 9** siguiente.

| Tabla 9              |                                         |                  |                  |                          |                                             |
|----------------------|-----------------------------------------|------------------|------------------|--------------------------|---------------------------------------------|
| Nombre               | Regiones Variables                      | Fc <sup>‡</sup>  | Cadenas          | SEQ ID NOs:              | Otros Componentes                           |
| DART B               | MAB 1 de CTLA-4<br>MAB de PD-1 de 6-ISQ | IgG4 (YTE)       | 1<br>2<br>3<br>4 | 95<br>96<br>95<br>96     | Hélices E/K;<br>véase Figura 3B             |
| DART C               | MAB 3 de CTLA-4<br>mAb de PD-1 de 6-ISQ | IgG4             | 1<br>2<br>3<br>4 | 97<br>98<br>97<br>98     | Hélices E/K;<br>véase Figura 3B             |
| DART D               | MAB de PD-1 de 6-ISQ<br>MAB 3 de CTLA-4 | IgG4 (YTE)       | 1<br>2<br>3<br>4 | 99<br>100<br>99<br>100   | Hélices E/K;<br>véase Figura 3B             |
| DART E               | MAB 3 de CTLA-4<br>mAb de PD-1 de 6-ISQ | IgG4 (YTE)       | 1<br>2<br>3<br>4 | 102<br>103<br>102<br>103 | CL/CH1; véase<br>Figura 3C                  |
| DART F               | MAB de PD-1 de 6-ISQ<br>MAB 3 de CTLA-4 | IgG1<br>(AA/YTE) | 1<br>2<br>3<br>4 | 101<br>100<br>101<br>100 | Hélices E/K;<br>véase Figura 3B             |
| TRIDENT A            | MAB de PD-1 de 6-ISQ<br>MAB 3 de CTLA-4 | IgG4 (YTE)       | 1<br>2<br>3<br>4 | 104<br>105<br>106<br>107 | Hélices E/K y<br>CL/CH1; véase<br>Figura 6A |
| TRIDENT B            | MAB de PD-1 de 6-ISQ<br>MAB 3 de CTLA-4 | IgG1<br>(AA/YTE) | 1<br>2<br>3<br>4 | 108<br>105<br>109<br>107 | Hélices E/K y<br>CL/CH1; véase<br>Figura 6A |
| MAB 6 de G4P de PD-1 | MAB de PD-1 de 6-ISQ                    | IgG4             | 1<br>2<br>3<br>4 | 88<br>89<br>88<br>89     | estructuras de anticuerpo natural           |
| MAB 1 de CTLA-4      | MAB 1 de CTLA-4 (ipilimumab replica)    | IgG1             | 4                | **                       | estructuras de anticuerpo natural           |
| MAB 3 de CTLA-4 G1AA | MAB 3 de CTLA-4                         | IgG1 (AA)        | 1<br>2<br>3<br>4 | 92<br>94<br>92<br>94     | estructuras de anticuerpo natural           |
| MAB 3 de CTLA-4 G4P  | MAB 3 de CTLA-4                         | IgG4             | 1<br>2<br>3<br>4 | 93<br>94<br>93<br>94     | estructuras de anticuerpo natural           |

‡ Las moléculas que incorporan Regiones de Fc de IgG4 también incorporan una Región de Bisagra de IgG4 estabilizada.

\*\* Misma secuencia de aminoácidos como ipilimumab (véase, por

*ejemplo*, Accesos a la Base de Datos Estructural IMGT 3D y 2D Nos. 8568\_H y 8568\_L).

**[00360]** Las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 adicionales que comprenden sitios de unión al epítipo de PD-1 y/o CTLA-4 alternativos pueden generarse fácilmente al incorporar Dominios de VH y VL diferentes. De forma similar, las moléculas comprenden Enlazadores, Regiones de Fc diferentes y/o que tienen estructuras alternativas que pueden generarse como se proporciona en la presente (*véase, por ejemplo, Tabla*  
 10 **8**).

#### **A. Estudios de Unión a ELISA**

**[00361]** Los estudios ELISA se llevaron a cabo para medir la unión de las moléculas de unión diluidas en serie (anticuerpo mAb 3 de G4P de CTLA-4, DART D, TRIDENT A o DARTB) en hCTLA-4-Avi-His soluble (1 µg/mL) o hPD-1-His (1 µg/mL) que ha sido recubierto sobre placas de soporte. Se empleó anti-humano-Fc-HRP de cabra (1:10,000) como la molécula de detección secundaria para detectar la unión. Los resultados de tales estudios se muestran en la **Tabla 10** y en las **Figuras 8A-8B**. Los datos muestran que las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que tienen dos sitios de unión para PD-1 y CTLA-4 (*por ejemplo, DART D y DART B*) mostraron unión a PD-1 y CTLA-4 que fue similar a aquella de sus anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 progenitores respectivos. Las moléculas biespecíficas de PD-  
 25 4

1 x CTLA-4 que tienen dos sitios de unión para PD-1 y un sitio de unión para CTLA-4 (*por ejemplo*, TRIDENT A) mostraron unión a PD-1 que fueron similares a aquellos del anticuerpo anti-PD-1 progenitor y mostraron unión reducida a CTLA-4 (en relación con aquel del anticuerpo progenitor) debido a la avidez reducida de la molécula trivalente, que comprendía únicamente un sitio de unión para CTLA-4. Se observaron resultados de unión similares para DART F y TRIDENT B que tenía Regiones de Fc de CH1 de IgG1 y/o IgG1(AA/YTE).

| Tabla 10               |                                         |                                       |
|------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|
| Constructo             | EC <sub>50</sub> de Unión a CTLA-4 (nM) | EC <sub>50</sub> de Unión a PD-1 (nM) |
| mAb 3 de G4P de CTLA-4 | 0.4                                     | N/A                                   |
| MAb 6 de G4P de PD-1   | N/A                                     | 0.3                                   |
| DART D                 | 0.4                                     | 0.3                                   |
| TRIDENT A              | 1.0                                     | 0.4                                   |
| DART B                 | 0.4                                     | 0.4                                   |

10 **[00362]** Se investigó el efecto de alterar las orientaciones y dominios de unión en la unión al incubar moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que comprenden los dominios de unión a CTLA-4 de mAb 1 de CTLA-4 (*por ejemplo*, DART B) y mAb 3 de CTLA-4 (*por ejemplo*, DART C y DART D) en presencia de PD-1 de humano soluble (**Figura 8C**), o CTLA-4-Avi-His de humano soluble (**Figura 8D**), que han sido recubiertas sobre placas de soporte. Se empleó anti-human-Fcγ-HRP de cabra como la molécula de detección secundaria para detectar la unión utilizando sustrato quimioluminiscente PICO. Los resultados indicaron que

15 las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 que comprenden los dominios de unión a CTLA-4 de mAb 1 de CTLA-4 (*por ejemplo*, DART B) y mAb 3 de CTLA-4 (*por ejemplo*, DART C y DART D)

20

mostraron unión similar a CTLA-4. No se encontró que la disposición de los dominios de unión (*es decir*, ubicación en la primera o segunda cadena) alterara significativamente la unión a PD-1 o CTLA-4 (compare la unión de DART C y DART D).

5

### **B. Estudios de Bloqueo ELISA**

**[00363]** Se llevaron a cabo una serie de estudios ELISA para evaluar la capacidad de moléculas biespecíficas de la invención para bloquear la unión de ligandos a PD-1 y CTLA-1, solos y en  
 10 combinación. El bloqueo de la unión de PD-L1 a PD-1 se evaluó en presencia de cantidades iguales de un antígeno irrelevante y en presencia de cantidades iguales de CTLA-4. Las placas se recubrieron con una mezcla 1:1 de PD-1 de humano soluble (shPD-1) etiquetado a His y un antígeno irrelevante etiquetado a His  
 15 (irrAg) (de 2 µg/ml cada uno), o una mezcla 1:1 de un CTLA-4 de humano a shPD-1 y soluble a una etiqueta de His (shCTLA-4) (de 2 µg/ml cada uno). Se mezclaron previamente mAb 6 de G4P de PD-1, DART D, TRIDENT A o a TRIDENTE DE CONTROL (que tienen dos sitios de unión para RSV y un sitio de unión para CTLA-4)  
 20 a las concentraciones indicadas durante 5 mins con 6 µg/ml de PD-L1 etiquetado con biotina y se agregaron a las placas. la unión a PD-L1 se detectó utilizando estreptavidina en HRP (1:3,000). Los resultados de esta evaluación se presentan en las **Figuras 9A-9B**. Se encontró que todas las moléculas de unión  
 25 a PD-1 probadas fueron capaces de inhibir PD-L1 unido a PD-1.

**[00364]** El bloqueo de la unión de B7-1 a CTLA-4 se evaluó en presencia de cantidades iguales de un antígeno irrelevante y en presencia de cantidades iguales de, o cuatro veces más de PD-1. Las placas se recubrieron con una mezcla 1:1 de shCTLA-4 e irrAg (de 2 µg/ml cada uno), una mezcla 1:1 de shPD-1 de shCTLA-4 (de 2 µg/ml cada uno), o una mezcla 1:4 de shCTLA-4 (0.8 µg/ml) y shPD-1 (3.2 µg/ml). Se mezclaron previamente mAb 6 de G4P de PD-1, DART D, TRIDENT A, mAb 3 de G4P de CTLA-4, o TRIDENTE de CONTROL a las concentraciones indicadas a los 5 minutos con 0.2 µg/ml de B7-1 etiquetado con biotina y se agregaron a las placas. la unión de B7-1 se detectó utilizando estreptavidina con HRP (1:3,000). Los resultados de esta evaluación se presentan en la **Figura 9C-9E**. Todas las moléculas de unión de CTLA-4 probadas probaron ser capaces de inhibir la unión de B7-1 a CTLA-4. Se encontró que el bloqueo de TRIDENT A de la unión de B7-1 se intensificó por la interacción de su brazo de unión a PD-1 interactuando con PD-1 inmovilizado (comparado con TRIDENT de CONTROL que no se une a PD-1) (**Figura 9D**). Más aún, bajo la condición de CTLA-4:PD-1 1:4, que mimetiza mejor los niveles de expresión relativa observados en células estimuladas (véase, **Figura 19A**), se encontró el bloqueo de TRIDENT A de la unión de B7-1 para intensificarse aún más (es decir, la curva de TRIDENT A se desplazó aún más comparada con la curva de TRIDENT de CONTROL, que no se une a PD-1) (**Figura 9E**).

[00365] Los resultados de estos estudios ELISA demuestran que todas las moléculas de unión a PD-1 probadas fueron capaces de inhibir PD-L1 de la unión de PD-1 (**Figuras 9A-9B**). Todas las moléculas fueron bivalentes para PD-1 y mostraron perfiles  
5 de inhibición similares. Todas las moléculas de unión a CTLA-4 probadas fueron capaces de inhibir B7-1 de la unión de CTLA-4 inmovilizada (**Figura 9C-9E**) con moléculas que comprenden dos sitios de unión a PD-1 y un sitio de unión a CTLA-4 mostrando una inhibición más fuerte en presencia de PD-1 (**Figura 9D-9E**).  
10 De este modo, las moléculas trivalentes que comprenden un sitio de unión a CTLA-4 sencillo mostraron un bloqueo sesgado de PD-1 de los ligandos de CTLA-4, demostrando que la interacción de CTLA-4 puede adaptarse al ajustar la valencia.

### 15 C. Estudios BIACORE®

[00366] Se investigó la afinidad de unión a DART A, TRIDENT A, y mAb 1 de CTLA-4 a CTLA-4 de humano y a CTLA-4 de monomolgus utilizando el análisis BIACORE®. Brevemente, el CTLA-4 soluble y etiquetado con His (una porción extracelular  
20 de CTLA-4 de humano o de monomolgus se fusiona a un péptido que contiene histidina) se capturó en anti-PentaHis inmovilizado y después se hicieron pasar diferentes concentraciones (12.5-200 nM) de las moléculas de unión de CTLA-4 por las proteínas de CTLA-4 inmovilizadas. Las cinéticas  
25 de unión se determinaron mediante análisis BIACORE® (afinidad

1:1 por el modelo de unión de Langmuir ( $k_a/k_d$  simultáneos); o a veces por el ajuste de  $k_a/k_d$  separado 1:1). Los  $k_a$ ,  $k_d$  y  $K_D$  calculados de estos estudios se presentan en la **Tabla 11**.

| <b>Tabla 11</b>  |                            |                               |            |                             |                               |            |
|------------------|----------------------------|-------------------------------|------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| <b>Molécula</b>  | <b>CTLA-4 de Humano</b>    |                               |            | <b>CTLA-4 de Cynomolgus</b> |                               |            |
|                  | $k_a$<br>( $\times 10^5$ ) | $k_d$<br>( $\times 10^{-4}$ ) | KD<br>(nM) | $k_a$<br>( $\times 10^5$ )  | $k_d$<br>( $\times 10^{-3}$ ) | KD<br>(nM) |
| MAb 1 de CTLA-4* | 6.6                        | 8.9                           | 1.4        | 10                          | 1.3                           | 1.3        |
| DART D*          | 2.3                        | 7.1                           | 3.1        | 3.5                         | 1.7                           | 4.9        |
| TRIDENT A†       | 1.2                        | 32                            | 26.7       | 2.5                         | 65                            | 260        |

\* a veces por el ajuste de  $k_a/k_d$  separado 1:1

5 † afinidad por el modelo de unión 1:1 de Langmuir

[00367] DART D es bivalente para CTLA-4 y muestra afinidades de unión a CTLA-4 de humano y mono cynomolgus que se encuentran dentro de alrededor de 2 a 4 veces que la de mAb 1 de CTLA-4. TRIDENT A es monovalente para CTLA-4 que muestra menor afinidad  
10 para CTLA-4 de humano y mono cynomolgus como se espera en vista de su a veces reducida.

[00368] Se investigó la afinidad de unión de DART A, TRIDENT A, mAb 6 de G4P de PD-1, y mAb 3 de G1AA de CTLA-4 un PD-1 de humano utilizando análisis BIACORE®. Las moléculas de unión se  
15 capturaron en Fc anti-humano de cabra de F(ab)<sub>2</sub> inmovilizado y después se hicieron pasar concentraciones diferentes (6.25-100 nM) de PD-1 de humano soluble etiquetado con His sobre las moléculas de unión inmunizadas, y se determinó la cinética de unión mediante el análisis BIACORE® (ajuste de unión 1:1 de  
20 Langmuir). Los  $k_a$ ,  $k_d$  y  $K_D$  calculados de estos estudios se presentan en la **Tabla 12** (n.d., no detectable).

| Tabla 12 |                |
|----------|----------------|
| Molécula | PD-1 de Humano |

|                      | $k_a$<br>( $\times 10^5$ ) | $k_d$<br>( $\times 10^{-4}$ ) | KD<br>(nM) |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------|------------|
| mAb 3 de CTLA-4 G1AA | n.d.                       | n.d.                          | n.d.       |
| MAb 6 de G4P de PD-1 | 6.2                        | 6.7                           | 1.1        |
| DART D               | 4.8                        | 8.1                           | 1.7        |
| TRIDENT A            | 5.2                        | 6.8                           | 1.3        |

**[00369]** Cada uno de DART A, TRIDENT A, mAb 6 de G4P de PD-1 fueron bivalentes para PD-1 y mostraron afinidades de unión comparables. Como se esperaba, mAb 3 de G1AA de CTLA-4 no mostró ninguna unión detectable para PD-1 de humano.

5

#### D. Ensayos a Base de Células CTLA-4

**[00370]** Se evaluaron DART B, DART D, TRIDENT A, anticuerpos anti-CTLA-4 y mAb 1 de CTLA-4, mAb 3 de G4P de CTLA-4, y un anticuerpo de control de hIgG para unirse a células de CHO que expresan CTLA-4 de mono cynomolgus (cynoCTLA-4) o CTLA-4 de humano (huCTLA-4). Los resultados de esta evaluación se muestran en las **Figuras 10A-10B**. Las moléculas de unión se incubaron en presencia de células de CHO que expresaron cualquiera de CTLA-4 de mono cynomolgus (**Figura 10A**) o CTLA-4 de humano (**Figura 10B**). La unión a tales células se detectó utilizando un anticuerpo secundario de Fc anti-humano. El resultado muestra que todas las moléculas probadas fueron capaces de unirse a CTLA-4 de humano y mono cynomolgus expresadas en la superficie de las células de CHO. Los anticuerpos anti-CTLA-4 mostraron perfiles de unión similares a huCTLA-4; las moléculas biespecíficas bivalentes de DART B y DART D mostraron una unión ligeramente reducida, y a la

20

molécula de unión trivalente. TRIDENT A, que es monovalente para CTLA-4 mostraron menor unión que las moléculas que tienen mayor valencia para CTLA-4. No se unió el anticuerpo de control. Se observaron resultados similares para unirse a cynoCTLA-4.

**[00371]** Se evaluaron DART C, DART D, DART E, TRIDENT A, anticuerpos anti-CTLA-4 y mAb 1 de CTLA-4, mAb 3 de G1AA de CTLA-4, y el anticuerpo anti-PD-1 mAb 6 de G4P de PD-1 para unirse a las células de Jurkat que expresan huCTLA-4 pero no PD-1 en su superficie. La unión de las moléculas DART y TRIDENT a CTLA-4 de humano se detectó utilizando el Ab secundario de FC anti-humano (FACS). Los resultados de la evaluación se muestran en la **Tabla 13** y la **Figura 11A** (DART C, DART D, DART E, mAb 1 de CTLA-4, mAb 3 de G1AA de CTLA-4, y mAb 6 de G4P de PD-1) y la **Figura 11B** (mAb 1 de CTLA-4, mAb 3 de G1AA de CTLA-4, mAb 6 de G4P de PD-1 y TRIDENT A). Como se muestra en las **Figuras 11A-11B**, el anticuerpos de PD-1 no se unión a CTLA-4, pero todas las moléculas de unión a CTLA-4 probadas fueron capaces de unirse a huCTLA-4 expresado en la superficie de las células de Jurkat. Los anticuerpos anti-CTLA-4 mostraron perfiles de unión similares; las moléculas biespecíficas bivalentes de DART C, DART D, y DART E mostraron una unión ligeramente reducida a las células de Jurkat y a la molécula de unión trivalente. TRIDENT A, que es monovalente para CTLA-4 mostró menos unión que las moléculas que tienen mayor

valencia para CTLA-4.

| <b>Tabla 13</b>      |                  |
|----------------------|------------------|
| <b>Molécula</b>      | <b>EC50 (nM)</b> |
| mAb 1 de CTLA-4      | 0.4215           |
| mAb 6 de G4P de PD-1 | 6.557            |
| mAb 3 de CTLA-4 G1AA | 0.3728           |
| DART E               | 1.269            |
| DART C               | 0.7575           |
| DART D               | 0.8829           |
| TRIDENT A            | 4.638            |

**[00372]** Se evaluaron DART D, TRIDENT A y anticuerpos anti-CTLA-4 y mAb 1 de CTLA-4, mAb 3 de G1AA de CTLA-4 para su capacidad de bloquear los ligandos B7-1 y B7-2 de CTLA-4. Los derivados B7-1 y B7-2 etiquetados con His se incubaron en presencia de células de Jurkat de CTLA-4. La unión de His-B7-1 y His-B7-2 se detectó utilizando un anticuerpo anti-His. Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Figura 12A** (His-B7-1) y **Figura 12B** (His-B7-2). Se encontró que todas las moléculas probadas fueron capaces de inhibir la unión de B7-1 y B7-2 de CTLA-4 expresada en la superficie de las células de Jurkat. Los anticuerpos anti-CTLA-4 mostraron perfiles de inhibición similares; la molécula biespecífica bivalente DART D fue ligeramente menos potente que un inhibidor y la molécula de unión trivalente. TRIDENT A, que es monovalente para CTLA-4 fue menos potente que cualquiera de las moléculas que tienen mayor valencia para CTLA-4. El anticuerpo de control no lo inhibió del todo. Los estudios ELISA descritos en lo anterior sugieren que TRIDENT A y moléculas similares que tienen dos sitios de unión a PD-1 y un sitio de unión a CTLA-4 podrían ser inhibidores más potentes en presencia de PD-1.

**[00373]** Se utilizó un ensayo de reportero de IL-2/Luc de células de Jurkat de CTLA-4 para evaluar la capacidad de DART C, DART D, TRIDENT A, mAb 3 de G1AA de CTLA-4 y mAb 6 de G4P de PD-1 para invertir la señal de inhibición del punto de control inmune de CTLA-4 como se demuestra por la expresión de luciferasa incrementada. Por lo tanto, las células de IL-2/Luc-Jurkat-CTLA-4 se incubaron en presencia de tales moléculas (R:S= 1 : 0.3) durante 30 min a 37°C, después de cuyo tiempo e agregaron células Raji que presentaban antígeno artificial y la incubación continuó durante 6 horas. Las células que presentaban un antígeno artificial activaron el complejo TCR/CD3 en las células reportera de Jurkat. Los resultados de la evaluación se muestran en la **Figura 13**. Todas las moléculas de unión de CTLA-4 probadas fueron capaces de invertir la señal de inhibición del punto de control inmune de CTLA-4 como se determinó por el ensayo de luciferasa. TRIDENT A, que fue monovalente para CTLA-4 fue menos potente en este ensayo que cualquiera de las moléculas que tienen mayor valencia para CTLA-4. El anticuerpo de control no se inhibió del todo. Los estudios ELISA descritos en lo anterior sugirieron que TRIDENT A, y las moléculas similares que tienen dos sitios de unión a PD-1y un sitio de unión a CTLA-4 fueron más potentes en presencia de PD-1.

**[00374]** Se evaluaron DART D, TRIDENT A, mAb 6 de G4P de PD-1, y mAb 3 de G1AA de CTLA-4 por su capacidad de unirse a células de NSO que expresan PD-1 pero no CTLA-4. Las moléculas de unión se incubaron en presencia de las células y se midió el índice de fluorescencia media de las células. Los resultados de esta evaluación se presentan en la **Figura 14**. Como se esperaba, el anticuerpo de CTLA-4 no se unió, se encontró que todas las moléculas biespecíficas de unión fueron capaces de unirse a PD-1 expresado en la superficie de las células de NSO. Todas las moléculas biespecíficas fueron bivalentes para PD-1 y mostraron unión similar a células de NSO.

**[00375]** Se evaluaron DART D, TRIDENT A, mAb 6 de G4P de PD-1, y mAb 3 de G1AA de CTLA-4 por su capacidad de bloquear la unión entre PD-1 expresada en la superficie celular y sus ligandos de PD-L1 y PD-L2. PD-L1-PE o PD-L2-PE se incubó en presencia de tales moléculas de unión y se evaluó su capacidad para unirse a las células de NSO-PD-1 utilizando FACS. Los resultados de esta evaluación se presentan en la **Figura 15A** (PD-L1) y **Figura 15B** (PD-L2). Como se esperaba, el anticuerpo de CTLA-4 no inhibió todas las moléculas de unión de PD-1 probadas que fueron capaces de inhibir PD-L1 (**Figura 15A**) y PD-L2 (**Figura 15B**) de la unión de PD-1 expresada en la superficie de las células de NSO. Todas las moléculas de unión de PD-1 fueron bivalentes para PD-1 y mostraron perfiles de inhibición similares.

[00376] También se evaluaron DART D, TRIDENT A, mAb 3 de G1AA de CTLA-4, y mAb 6 de G4P de PD-1 en un ensayo de reportero de bloqueo de PD-1. Tales moléculas de unión se incubaron en presencia de células de CHO y efectoras de Jurkat de PD-L1<sup>+</sup>, y  
5 se evaluó la capacidad de las moléculas de unión para bloquear la inhibición inmune (al bloquear la interacción de PD-1/PD-L1) al seguir el grado de activación mediada por CD3 (como se demuestra por la expresión de luciferasa incrementada en el ensayo de NFAT-luc/Jurkat de PD-1; Promega). Los resultados de  
10 esta evaluación se presentan en la **Figura 16**. Todas las moléculas de unión de PD-1 probadas fueron capaces de invertir la señal inhibidora de puntos de control inmune de PD-1 como se demuestra por la expresión de luciferasa incrementada. Todas las moléculas de unión de PD-1 fueron bivalentes para PD-1 y  
15 mostraron capacidad similar para inhibir el bloqueo de PD-1 de la señalización de células T. El anticuerpo de CTLA-4 no inhibió del todo en este sistema.

#### **F. Ensayos a base de Células de CTLA-4/PD-1**

20 [00377] Se examinaron DART D, TRIDENT A, y un diacuerpo de control negativo de su capacidad para co-ligar PD-1 y CTLA-4 en un ensayo de complementación del fragmento de enzima por DiscoverX. En breve, las alícuotas de la línea celular #9 de CTLA-4(1-195)-PK PD-1(1-199)-EA de U2OS se sembraron en placas  
25 por cuadruplicado en 5,000 células/pozo en un medio de sembrado

de placas CP5 de DiscoverX en placas de 384 pozos. A las células se les dejó unirse durante 4 horas a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5%. Entonces se agregaron series de dilución 1:3 de 11 puntos de cada una de las moléculas de unión a las células PD-1-CTLA-4. Las placas se incubaron durante la noche (16 hrs) a 37°C/CO<sub>2</sub> al 5%. Se agregó el reactivo de detección PathHunter a los pozos, los cuales luego se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en la oscuridad, y después la placa se leyó en un luminómetro Envision. Los resultados de esta evaluación se presentan en la **Tabla 14** y **Figura 17** (línea celular #9 de CTLA-4(1-195)-PK PD-1(1-199)-EA de U2OS). Ambas moléculas biespecíficas DART D y TRIDENT A mostraron un co-acoplamiento comparable de PD-1 y CTLA-4 en células que coexpresaron ambos receptores, como se muestra por la complementación de fragmentos de enzimas, que indican que las moléculas biespecíficas de la invención son capaces de la unión simultánea de PD-1 y CTLA-4, e indican aún más que el anclaje a través de PD-1 se compensa para la avidez de CTLA-4 reducida de la molécula TRIDENT cuando se expresan ambos receptores objetivos. Esta unión es consistente con los estudios de inhibición ELISA descritos en lo anterior. El control negativo no obtuvo un incremento significativo en la señal de la línea celular de PD1-CTLA4. La incubación con mayores concentraciones de TRIDENT A obtuvo un incremento de la señal robusta en la línea celular de dimerización de PD1-CTLA4 de U2OS (S:B=12.7).

La respuesta con DART D en las pruebas de respuesta de la dosis, la línea celular de PD-1-CTLA-4 fue de magnitud más pequeña (S:B=9.2) pero los valores EC50 fueron similares en estas moléculas (EC50=20 pM).

| Tabla 14  |                              |                         |                         |
|-----------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|           | Control Negativo             | TRIDENT A               | DART D                  |
| HillSlope | ~15.99                       | 1.103                   | 0.8095                  |
| EC50 (nM) | $\sim 6.883 \times 10^{-10}$ | $2.123 \times 10^{-11}$ | $2.090 \times 10^{-11}$ |

5 **[00378]** Se evaluó la capacidad de DART D, TRIDENT A, mAb 3 de G1AA de CTLA-4, mAb 6 de G4P de PD-1 y las combinaciones de mAb 3 de G1AA de CTLA-4/G4P de mAb 6 de PD-1 (Combo 1 de Ab) para intensificar la respuesta de una Reacción Mezclada de Linfocitos (MLR). Las células dendríticas derivadas de

10 monocitos se generaron al tratar monocitos de CD14+ (aislados de los PBMC que utilizan el kit de selección positiva Miltenyi) con GM-CSF (100 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml) y después se cultivaron las células durante 7 días. En el día 7, las células se cosecharon y sembraron en placas de 96 pozos y se cultivaron

15 durante 24 h. En el día 8, se agregaron células T de CD4+ (aisladas por selección negativa utilizando el kit Myltenyi) a 200,000 células/pozo y los artículos de prueba y se cultivaron durante 3 días. Los niveles de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo entonces se midieron utilizando los Kits ELISA DuoSet

20 para IFN- $\gamma$  (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando se utilizaron los anticuerpos en combinación, cada anticuerpo se agregó a la concentración indicada a modo que se duplicara la concentración total del

anticuerpo agregado. La liberación de IFN- $\gamma$  se grafica en la **Figura 18**. Se encontraron ambas moléculas biespecíficas DART D y TRIDENT A para intensificar la respuesta MLR en el mismo grado o ligeramente mejor que la combinación de anticuerpos progenitores individuales.

[00379] También se evaluó la capacidad de DART D, TRIDENT A, mAb 3 de G1AA de CTLA-4, mAb 6 de G4P de PD-1 y la combinación de mAb 1 de CTLA-4/mAb 1 de PD-1 (Combo 1 de Ab) para intensificar la liberación de citocinas a través de la inhibición de los puntos de control en un ensayo de reestimulación de enterotoxina tipo B (SEB) de *Staphylococcus aureus*. En general, los PBMC se purificaron a partir de sangre completa (por ejemplo, utilizando el método de centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante) de donadores saludables. Los PBMC purificados se cultivaron en medio RPMI + FBS inactivado por calor al 10% + Penicilina/Estreptomicina al 1% en matraces volumétricos T-25 durante 2-3 días solos o con SEB (por ejemplo, Sigma-Aldrich) a 0.5 ng/mL (estimulación primaria). Al final de la primera ronda de estimulación con SEB, los PBMC se lavaron dos veces con PBS y se sembraron en placas de forma inmediata en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos a una concentración de  $1-5 \times 10^5$  células/pozo en medio solo, en medio con un control o un artículo de prueba, en medio con SEB a 0.5 ng/mL (estimulación secundaria) y sin anticuerpo,

o en medio con SEB y una IgG de control o un artículo de prueba, y se cultivaron durante 2-3 días adicionales. Al término de la segunda estimulación, los sobrenadantes se cultivaron para medir la secreción de citocina (por ejemplo, utilizando Kits  
5 ELISA DuoSet DE HUMANO PARA IFN $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ , IL-10, y IL-4 (R&D Systems) de acuerdo con LAS instrucciones del fabricante).

[00380] Las **Figuras 19A-19B** muestran gráficos de punto que clasifican las células activadas por fluorescencia (FACS) de la expresión de PD-1 contra CTLA-1 por tales PBMC en ausencia  
10 (**Figura 19A**) o presencia (**Figura 19B**) de estimulación con SEB. La **Figura 19C** muestra el efecto de la estimulación con SEB en la secreción de IFN- $\gamma$ . Los PBMC se estimularon con la enterotoxina tipo B (SEB) de *Staphylococcus aureus* a 0.5 ng/ml durante 48 horas. Las células entonces se cosecharon,  
15 se lavaron y volvieron de nuevo a sembrarse en placas de 96 pozos con anticuerpos en diversas concentraciones con SEB recién preparada durante 48 horas adicionales. El sobrenadante entonces se cosechó y analizó por ELISA con citometría de flujo para la producción de IFN- $\gamma$ . Las proteínas DART y the TRIDENT  
20 biespecíficas mostraron un incremento en la respuesta de IFN- $\gamma$  que recapituló la respuesta observada con la combinación de los mAb progenitores individuales. Se observaron resultados similares en un ensayo de estimulación con SEB en el cual los PBMC se cultivaron con una alta concentración (500 ng/mL) de  
25 SEB durante 72 horas. Para investigar aún más el efecto de las

moléculas biespecíficas de PD1 x CTLA-4 en la respuesta de las células T, los PBMC se estimularon con 0.5 ng/ml de SEB durante 48 horas, se cosecharon, se lavaron y volvieron de nuevo a sembrarse en placas de 96 pozos con SEB recién preparada y cualquiera de DART D, TRIDENT A, mAb 3 de G1AA de CTLA-4, mAb 6 de G4P de PD-1 o la combinación de mAb 3 de G1AA de CTLA-4/mAb 6 de G4P de PD-1 (Combo 1 de Ab) durante 48 horas adicionales, y se midió la IL-2 liberada (**Figura 19D**). Las **Figuras 19A-19D** muestran que la administración de las moléculas biespecíficas de PD1 x CTLA-4 intensificaron significativamente las respuestas de las células T. Cuando se utilizaron anticuerpos en combinación, cada anticuerpo se agregó a la concentración indicada a modo que se duplicara la concentración total del anticuerpo agregado.

15

### **Ejemplo 6**

#### **Estudios In Vivo**

##### **A. Actividad de una molécula biespecífica de PD-1 x CTLA-4 en el Modelo GVHD de Murino**

20 **[00381]** La actividad de una molécula biespecífica bivalente de PD1 x CTLA-4 representativa, se evaluó DART D en un modelo de NOG de murino implantado en PBMC de Enfermedad de Injerto Contra Huésped (GVHD). EL diseño de estudio se presenta en la **Tabla 15**.

|                 |
|-----------------|
| <b>Tabla 15</b> |
|-----------------|

| Grupo | N/sexo | Tratamiento | Dosis (µg/kg) | Vía/ Esquema | Implantes celulares |
|-------|--------|-------------|---------------|--------------|---------------------|
| 1.    | 7/F    | DART D      | 500           | IV/Q7D x 7   | PBMC (IP, 1E7)      |
| 2.    | 7/F    | DART D      | 50            | IV/Q7D x 7   | PBMC (IP, 1E7)      |
| 3.    | 7/F    | DART D      | 5             | IV/Q7D x 7   | PBMC (IP, 1E7)      |
| 4.    | 7/F    | Vehículo    | 0             | IV/Q7D x 7   | PBMC (IP, 1E7)      |

[00382] Los conteos de células T de CD3+ se realizaron mediante FACS en el día de estudio 14 y se graficaron en la **Figura 20A**. Se monitoreó la sobrevivencia durante el curso del estudio y se graficó como por ciento de sobrevivencia en la **Figura 20B**. La expansión de las células T incrementadas y GVHD acelerada se observó en animales tratados con 500 µg/kg de DART D, consistente con la intensificación de las respuestas inmunes de las células T.

## B. Estudio de Toxicología y Farmacocinética de Moléculas Biespecíficas de PD-1 x CTLA-4

[00383] El perfil de seguridad de una molécula bivalente biespecífica de PD1 x CTLA-4, DART D, y una molécula trivalente biespecífica de PD1 x CTLA-4 representativa, TRIDENT A, se evaluó en un estudio de dosificación sin GLP (Buenas Prácticas de Laboratorio) en monos cynomolgus. Además, se examinaron diversos marcadores de actividad farmacodinámica.

[00384] En este estudio, se evaluó la toxicidad potencial de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 cuando se administraron por múltiples administraciones intravenosas. EL

diseño de estudio se presenta en la **Tabla 16**.

| <b>Tabla 16</b> |                           |                      |                      |                           |
|-----------------|---------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|
| <b>Grupo</b>    | <b>Artículo de Prueba</b> | <b>Dosis (mg/kg)</b> | <b>Días de Dosis</b> | <b>Número de Animales</b> |
| 1               | Control                   | 0                    | 1, 8, 15             | 1M 1F                     |
| 2               | DART D                    | 50                   | 1, 8, 15             | 3M 3F                     |
| 3               | DART D                    | 75                   | 15, 22, 29           | 3M 3F                     |
| 4               | TRIDENT A                 | 5                    | 1                    | 2M 1F                     |

[00385] Se proporcionó de este modo un intervalo de 2 semanas entre la dosis de 50 mg/kg y escalación a 75 mg/kg. Los siguientes parámetros y criterios de valoración se evaluaron en este estudio: signos clínicos, pesos corporales, consumo de alimento, temperatura corporal, parámetros de patología clínica (coagulación, química clínica y hematología previa a la dosis y 23 horas después de la dosis para los Grupos 1-3; en el Día 22 para el Grupo 4), bioanálisis y parámetros toxicocinéticos, citometría de flujo (previa a la dosis y 23 horas después de la dosis), citocinas (2, 6, 22 horas después de la dosis). Se evaluaron Anticuerpos Anti-Fármaco para el Grupo 4 únicamente en los días 8, 15 y 22. Se realizó la necropsia 48 horas después de la 3a dosis únicamente para los Grupos 1-3. También se examinó la unión *in vivo* actividad de las moléculas biespecíficas de PD-1 x CTLA-4 como se describe a continuación.

[00386] Todos los animales sobrevivieron hasta la eutanasia programada. No hubo observaciones clínicas adversas en los animales que recibieron 3 dosis hasta de 75 mg/kg/semanas. En particular, no se observó diarrea. La histopatología tampoco fue notable. Se observaron incrementos en los niveles de

globulina en los grupos de tratamiento y se observó que el peso de los órganos del bazo y timo incrementó en los Grupos 2-3 (véase la **Tabla 17**, el Grupo 4 no se sometió a necropsia), como podría observarse después de la estimulación del sistema

5 inmune. Los perfiles de tiempo de concentración en suero para cada uno de los grupos de tratamiento se muestran en las **Figuras 21A-21C** y fueron consistentes con moléculas que comprenden Regiones de Fc de humano en monos cynomolgus.

| <b>Tabla 17</b> |                           |                      |                            |                            |
|-----------------|---------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>Grupo</b>    | <b>Artículo de Prueba</b> | <b>Dosis (mg/kg)</b> | <b>Bazo: Peso Corporal</b> | <b>Timo: Peso Corporal</b> |
| 1               | Control                   | 0                    | 0.080 (media, n=2)         | 0.035 (media, n=2)         |
| 2               | DART D                    | 50                   | 0.239 (media, n=6)         | 0.088 (media, n=6)         |
| 3               | DART D                    | 75                   | 0.225 (media, n=6)         | 0.084 (media, n=6)         |

**[00387]** Se ha reportado que el incremento en el conteo

10 absoluto de linfocitos (ALC) después del tratamiento con el anticuerpo anti-CTL4 de ipilimumab pareció correlacionarse con el beneficio clínico y supervivencia general (véase, por ejemplo, Ku, G.Y., et al. (2010) "Single-Institution Experience with Ipilimumab In Advanced Melanoma Patients In The

15 *Compassionate Use Setting: Lymphocyte Count After 2 Doses Correlates con Survival*" Cancer 116(7):1767-1775) indicando que ALC puede ser un criterio de valoración de farmacodinámica (PD) útil. Los conteos de ALC se examinaron en cada uno de los grupos de tratamiento previo y tratamiento posterior descritos

20 en lo anterior en los días 2, 8, 9, 15 y 16. La ocupación de los sitios de unión DART D o TRIDENT A en células T de PD-1+ se determinó al medir la intensidad fluorescente media (MFI)

de los eventos de IgG4 anti-humana de Alexa 488+ en las poblaciones celulares de CD4+/PD-1+ y CD8+/PD-1+ T bajo dos condiciones para cada muestra de sangre de mono. Bajo una condición, los valores MFI obtenidos en presencia de DART D o  
 5 TRIDENT A en exceso se utilizaron para determinar la intensidad

$$\begin{array}{c} \% \text{ de ocupación de los sitios de unión de} \\ \text{DART D o TRIDENT A en PD-1 + Subconjuntos} \\ \text{de Células T} \end{array} = \left[ \frac{\left( \begin{array}{c} \text{MFI de Anti-HuIgG4 + Eventos en} \\ \text{Presencia de AEX1367 en Exceso} \end{array} \right)}{\left( \begin{array}{c} \text{MFI de Anti-HuIgG4 + Eventos en} \\ \text{Presencia de DART D o TRIDENT A en Exceso} \end{array} \right)} \right] \times 100$$

de unión a DART D o TRIDENT A máxima en células de PD-1+ dentro de cada población celular. Bajo la segunda condición, los valores MFI obtenidos en presencia de control negativo en exceso se utilizaron para determinar la intensidad de unión de  
 10 las células de PD-1+ dentro de cada población celular mostrada en el animal tratado con DART D o TRIDENT A al momento de la recolección de la muestra. La diferencia entre las dos condiciones se utilizó para calcular el % de ocupación de los sitios de unión a DART D o TRIDENT A en subconjuntos de células  
 15 T de PD-1+ en animales tratados con DART D o TRIDENT A como sigue:

**[00388]** Los conteos absolutos, y el por ciento de cambio normalizado en el Día 1 se grafican en la **Figura 22A** (en miles de células / $\mu$ l (th/ $\mu$ l)) y en la **Figura 22B** (por ciento de  
 20 cambio en ALC normalizado en el Día 1 (D1)). Cada uno de los grupos de tratamiento de DART D mostraron una caída inicial en

los conteos de ALC inmediatamente después del tratamiento seguido por un incremento en ALC en los niveles bien por encima del valor de referencia. Se observe una tendencia similar para el grupo de tratamiento con TRIDENT A, el cual solo recibió  
5 únicamente una dosis menor.

**[00389]** Además, se examinaron la proliferación de células T de CD4+ y ocupación de PD-1 en células T para los Grupos 1-3 descritos en lo anterior. Brevemente, las células T de CD3+/PD-1+ se analizaron por FACS para evaluar el por ciento de células  
10 unidas por DART D. Se agregaron cuarenta microlitros de la molécula de control negativo (virus sincicial respiratorio (RSV) x fluoresceína de IgG4,  $\kappa$  Fc DART) o artículo de prueba (DART D o TRIDENT A) a 35  $\mu$ g/mL a una placa de 96 pozos profundos. Entonces se agregaron cien microlitros en cada pozo  
15 de sangre completa anticoagulada bien mezclada, a través de toda la mezcla utilizando una pipeta, y se incubaron en la oscuridad durante 45 a 75 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron mil microlitos de 1x una solución de Lisado FACS de BD a cada pozo y se mezclaron utilizando una  
20 pipeta; la placa entonces se incubó en la oscuridad durante 10 a 20 minutos adicionales a temperatura ambiente. La placa después se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Se agregaron mil microlitros de solución reguladora de bloqueo FACS en cada pozo y se mezclaron como  
25 una etapa de lavado. La placa después se centrifugó a 400 x g

durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. La pelletilla celular se resuspendió en veinte microlitos de la mezcla de anticuerpos del Panel 1 y se incubaron durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó como en las etapas de lavado previas. Al final de la incubación, la placa se lavó de nuevo y la pelletilla celular finalmente se resuspendió en trescientos microlitros de solución reguladora de bloqueo FACS y las muestras se analizaron con un analizador celular FACSCanto II de BD. Los resultados del análisis se muestran en las **Figuras 23A-23B**.

**[00390]** Como se muestra en la **Figura 23A** (para DART D administrado a 50 mg/kg) y la **Figura 23B** (para DART D administrado a 75 mg/kg), la ocupación de PD-1 (*es decir*, la unión por DART D) fue máxima a través de toda la duración del tratamiento para los Grupos 2 y 3. La proliferación de células T de CD4+ se evaluaron por FACS para la co-expresión de Ki-67 (un marcador celular para proliferación).

**[00391]** Se agregaron veinte microlitros de una mezcla A de anticuerpo (que contiene anticuerpos que unen marcadores de superficie celular: CD45, CD3, CD4, y CD8) en una placa de 96 pozos profundos. Entonces se agregaron cincuenta microlitros de sangre completa anticoagulada bien mezclada en cada pozo, se mezcló a través de todo utilizando una pipeta, y se incubaron en la oscuridad durante 15 a 45 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron quinientos microlitros de 1x solución de

Lisado FACS de BD a cada pozo y se mezclaron utilizando una pipeta; la placa después se incubó en la oscuridad durante 10 a 20 minutos adicionales a temperatura ambiente. La placa se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y se desechó el  
5 sobrenadante. Entonces se agregaron quinientos microlitros de solución reguladora de bloqueo FACS en cada pozo y se mezclaron como una etapa de lavado. La placa luego se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. La pelotilla celular se resuspendió en una mezcla B de anticuerpos  
10 (que contiene anticuerpos que unen el marcador intracelular, Ki 67) o se resuspendió en una preparación de anticuerpos ISO (que contiene controles de isotipo para el marcador intracelular) y se incuban en la oscuridad durante 15 a 45 minutos. Después del lavado, se resuspendió la pelotilla  
15 celular en trescientos microlitos de solución reguladora de bloqueo FACS y las muestras se analizaron con un analizador celular FACSCanto II de BD. A partir de un Panel de Tinción Intracelular de Células T, se determine el porcentaje de células de CD4+ y CD8+ como la fracción de células separadas por leucocitos de CD45+ totales. Los eventos celulares Ki 67+  
20 en células de CD4+ separadas se contaron y el porcentaje de células T 67+ de CD4+/Ki (células T de CD4 proliferativas) se determinó como la fracción de células de CD4+ totales. De una manera similar, el porcentaje de células T 67+ de CD8+/Ki  
25 (células T de CD8 proliferativas) se determinó como la fracción

de células de CD8+ totales. Los resultados de los análisis se muestran en las **Figuras 24A-24B**.

[00392] Como se muestra en las **Figuras 24A-24B**, la proliferación de células T de CD4+ se intensificó de forma  
5 remarcada en los Grupos 2 y 3 de tratamiento a través de la duración del tratamiento. Los resultados de este estudio indicaron que la administración de moléculas biespecíficas de PD1 x CTLA-4 fue bien tolerada en monos cynomolgus a concentraciones de hasta 75 mg/kg bien por encima de los  
10 5 mg/kg de dosificación donde se han reportado eventos adversos para monos cynomolgus tratados con Ipilimumab. Las moléculas mostraron un perfil farmacocinético favorable y se observó un número de actividad farmacodinámica de marcadores incluyendo el conteo de linfocitos incrementado, niveles de globulina  
15 incrementados, pesos de órganos de bazo y timo incrementado, proliferación de células T incrementada (tanto los conteos de células T como la expresión de Ki-67) y ocupación máxima de PD-1 en células T.

[00393] Todas las publicaciones y patentes mencionadas en  
20 esta especificación se incorporan en la presente para referencia en el mismo grado como si cada publicación individual o solicitud de patente fueran específica e individualmente indicadas para incorporarse para su referencia en su totalidad. Mientras que la invención se ha descrito junto  
25 con las modalidades específicas de la misma, se entenderá que

es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud pretende abarcar cualesquier variaciones, usos, o adaptaciones de la invención seguida, en general, de los principios de la invención e incluyen tales salidas de la presente descripción  
5 como que se encuentran dentro de la práctica conocida o personalizada dentro de la técnica a la cual pertenece la invención y como puede aplicarse a las características esenciales establecidas en lo sucesivo en la presente.